

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Parazitologie



Bc. Pavlína Vobořilová

Výskyt patogenních trichomonád u koček a psů

Pathogenic trichomonads in cats and dogs

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Praha 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 14. 8. 2014

.....

podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla vyjádřit velké poděkování svému školiteli prof. Janu Tachezemu, Ph.D. Bez jeho pomoci, cenných rad a věcných připomínek by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji za poskytnutí materiálního zázemí i odborné vedení, a za velkou trpělivost při sepisování této práce.

Velice bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Jaroslavu Kuldovi, CSc. za odborné rady zejména s kultivací, barvicími technikami a za cenné připomínky a pomoc při morfologické a ultrastrukturální studii.

Dále bych ráda poděkovala MVDr. Markétě Kuldové a MVDr. Samuelovi Evinicovi za obětavou pomoc při odebírání vzorků. Děkuji všem majitelům a ošetřovatelům psů a koček v útulcích, kteří mi umožnili vyšetřit jejich psy a kočky. Za cenné rady v oboru veterinářství děkuji MVDr. Vilmě Kajerové, Ph.D. a MVDr. Martině Taslerové. Velice děkuji také doc. RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D. za pomoc a odborné připomínky v začátcích této práce. Dále děkuji RNDr. Janě Rubešové, Ph.D. a především RNDr. Bohumíru Procházce, CSc. za vřelou pomoc a rady týkající se statistických analýz a práce v programu R. Děkuji RNDr. Evě Nohýnkové, Ph.D. za pomoc při fixaci vzorků pro elektronovou mikroskopii, za vstřícnost a možnost pracovat v její laboratoři. Děkuji celému kolektivu laboratoře Oddělení tropické medicíny 1. LF UK v Praze za příjemné prostředí.

Můj velký dík patří Honzovi Machovi za bezmeznou ochotu mi kdykoli poradit a pomoci v průběhu celé mé práce. Pavle Smejkalové za mnoho podnětných připomínek při sepisování diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem lidem z naší Laboratoře molekulární a biochemické parazitologie za pomoc a za velmi přátelské prostředí a příjemně strávený čas. Obzvláště bych pak chtěla poděkovat za pomoc při každodenní práci v laboratoři Míše Marcinčíkové a Evě Nývtové.

Za podporu, důvěru a shovívavost během celého studia hluboce děkuji především své rodině a v neposlední řadě děkuji Sašovi za pomoc při odběru vzorků a bezmeznou podporu a pochopení během celého projektu.

ABSTRAKT

Trichomonády jsou anaerobní bičíkovci zahrnující komenzální a parazitické druhy, kteří se často vyskytují v zažívacím, respiračním a urogenitálním traktu obratlovců včetně psů a koček. U těchto hostitelů byli v ústní dutině popsáni dva komenzálové *Tetratrichomonas canistomae* a *Tetratrichomonas felistomae*. V zažívacím traktu psů a koček byl pak popsán komenzál *Pentatrichomonas hominis*, který se také vyskytuje u jiných savců včetně lidí, a patogen *Tritrichomonas foetus* způsobující chronické průjemové onemocnění u koček. Ačkoli jsou trichomonády u psů a koček pravděpodobně kosmopolitně rozšířeny, jejich výskyt v České republice není znám.

Cílem této studie bylo (i) rozlišit druhy trichomonád přítomných v orální dutině psů a koček a získat předběžná epidemiologická data a (ii) prokázat přítomnost *Tritrichomonas foetus* u psů a koček v České republice a stanovit potenciální rizikové faktory s nákazou. Přítomnost trichomonád u psů a koček byla diagnostikována kultivací a pomocí „nested“ PCR. Určení trichomonád do druhu bylo provedeno na základě sekvenční a fylogenetické analýzy úseku genu ITS1-5.8SrRNA-ITS2. Dodatečně druhová příslušnost byla ověřena morfologicky. Trichomonády byly diagnostikovány u různých populací psů a koček a informace o každém zvířeti včetně zdravotního stavu byla zaznamenána do dotazníku. Z epidemiologických dat byla pomocí postupné logistické regrese zjišťována souvislost mezi infekcí trichomonádami a demografickými a zdravotními faktory.

V této práci byl popsán nový druh trichomonády rodu *Trichomonas* z ústní dutiny psů a koček, pro který bylo navrženo jméno *Trichomonas bixi*. V ústní dutině psů a koček byl rovněž nečekaně zjištěn výskyt lidského komenzála *Trichomonas tenax*. Dříve popsání dva komenzálové z ústní dutiny psů a koček *Tetratrichomonas canistomae* a *Tetratrichomonas felistomae* nebyly v této studii nalezeny. V zažívacím traktu koček byl poprvé v České republice zjištěn výskyt patogenního prvoka *Tritrichomonas foetus* a jeho výskyt je pravděpodobný rovněž i u psů. Celková prevalence orálních trichomonád bez rozlišení druhu u psů byla 45,2 % (57/126) a u koček 19,3 % (26/135). Prevalence *Trichomonas bixi* v ústní dutině psů byla 30,6 % (34/111), u koček byla 6,6 % (8/122) a *Trichomonas tenax* byla u psů 8,1 % (9/111) a u koček 4,1 % (5/122). *Tritrichomonas foetus* byl nalezen u 36 % psů (4/11) a 21,9 % koček (16/73). Navíc byl v intestinálním traktu zjištěn *Pentatrichomonas hominis* u 4 ze 73 koček, z čehož dvě byly také pozitivní na *T. foetus*. Naše studie prokázala výskyt *T. foetus* v České republice a rozlišila druhy orálních trichomonád u psů a koček.

Klíčová slova: *Trichomonas*, *Tetratrichomonas*, kultivace, nested PCR, prevalence.

ABSTRACT

Trichomonads are anaerobic flagellated protists that are either parasites or commensals. They frequently inhabit digestive, respiratory, and urogenital tracts of vertebrates, including domestic cats and dogs. In these hosts, four trichomonad species has been described: *Tetratrichomonas canistomae* and *Tetratrichomonas felistomae* that are commensals of the host oral cavity; *Pentatrichomonas hominis*, a commensal of intestinal tract that could be found in dogs and cats but also in other mammals including humans; and pathogenic *Tritrichomonas foetus* that causes, in addition to cattle infection, feline intestinal trichomonosis. Although, trichomonads in dogs and cats are probably of cosmopolitan distribution we have no information about their presence in Czech Republic.

The first aim of this study was to distinguish types of trichomonads present in the oral cavity of dogs and cats and to get preliminary epidemiological data. The second aim was to demonstrate the presence of *Tritrichomonas foetus* in cats and dogs in the Czech Republic and to identify potential risk factors for the disease. Cultivation and nested PCR were used to determine the presence of trichomonads in dogs and cats. Sequencing and phylogenetic analysis based on ITS1-5.8rRNA-ITS2 gene sequence was used to identify species of isolated trichomonads. A cross-sectional study was conducted involving cats and dogs from different populations. Host management information was assessed through a questionnaire. Odds ratios (OR) with 95% confidence intervals and P values were calculated by stepwise logistic regression to estimate the magnitude of association between demographic information and the trichomonad infection.

In this study we describe a new *Trichomonas* species from the mouth of dogs and cats, which we suggest to be named *Trichomonas bixi*. Unexpectedly, we also found another trichomonad in mouth of dogs and cats *Trichomonas tenax*, which is known as a commensal from the mouth of human. None of isolated samples belong to previously described *Tetratrichomonas canistomae* and *Tetratrichomonas felistomae*. For the first time was identified *Tritrichomonas foetus* in cats in Czech Republic, with probability of occurrence also in dogs. The prevalence of all oral trichomonads (without species differentiation) was 45,2 % (57/126) in dogs and 19,3 % (26/135) in cats. The prevalence of *Trichomonas bixi* from the mouth of dogs and cats were 30,6 % (34/111) and 6,6% (8/122), respectively and of *Trichomonas tenax* were 8,1 % (9/111) in dogs and 4,1 % (5/122) in cats. *Tritrichomonas foetus* was found in the intestine of 36% of dogs (4/11) and 21,9 % of cats (16/73). Furthermore *Pentatrichomonas hominis* was detected in 4 out of 73 cats, of which two were also positive for *T. foetus*. Our study demonstrated the occurrence of *T. foetus* in the Czech Republic and distinguished species of oral trichomonads in dogs and cats.

Keywords: *Trichomonas*, *Tetratrichomonas*, cultivation, nested PCR, prevalence.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍLE PRÁCE	8
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
3.1. Trichomonády	9
3.1.1. Morfologie	9
3.1.2. Buněčný cyklus	10
3.2. Trichomonády ústní dutiny psů a koček	11
3.2.1. <i>Tetratrichomonas canistomae</i>	11
3.2.2. <i>Tetratrichomonas felistomae</i>	12
3.2.3. <i>Trichomonas tenax</i>	13
3.3. Jiné veterinárně významné druhy trichomonád z dutiny ústní	16
3.3.1. <i>Trichomonas gallinae</i>	16
3.4. Střevní trichomonády u psů a koček	17
3.4.1. <i>Pentatrichomonas hominis</i>	17
3.4.2. <i>Tritrichomonas foetus</i>	21
3.4.3. Trichomoniáza psů	25
3.4.4. Trichomoniáza u koček	25
4. MATERIÁL A METODIKA	39
4.1. Složení a příprava kultivačních médií	39
4.1.1. Dvoufázové médium dle Dobella a Leidlaw (1926), modifikováno	39
4.1.2. Médium dle Wenricha	40
4.1.3. Médium TYSGM-9 (Diamond 1982), modifikováno	40
4.1.4. Diamondovo médium TYM (1957)	41
4.1.5. Média pro transformaci <i>E. coli</i>	42
4.2. Použité metody a techniky	43
4.2.1. Příprava a zpracování trvalých preparátů	43
4.2.2. Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii	46

4.2.3.	Stabilizace kultur v kapalném dusíku.....	48
4.2.4.	Izolace DNA.....	48
4.2.5.	Nested PCR.....	49
4.2.6.	Gelová elektroforéza a purifikace PCR produktu	51
4.2.7.	Klonování.....	52
4.3.	Diagnostické metody.....	53
4.3.1.	Orální trichomonády	53
4.3.2.	Střevní trichomonády.....	54
4.4.	Zpracování sekvenačních dat	55
4.4.1.	Fylogenetické analýzy.....	55
4.5.	Statistická analýza a vyhodnocení dotazníků.....	56
5.	VÝSLEDKY	57
5.1.	Orální trichomonády	57
5.1.1.	Charakteristika studovaných populací.....	57
5.1.2.	Detekce trichomonád.....	62
5.1.3.	Druhová identifikace	67
5.2.	Střevní trichomonády	72
5.2.1.	Charakteristika studovaných populací.....	72
5.2.2.	Detekce a identifikace střevních trichomonád	76
5.2.3.	Kazuistiky.....	81
5.3.	Prevalence a asociované faktory nákazy	82
5.3.1.	Orální trichomonády	82
5.3.2.	<i>Tritrichomonas foetus</i>	94
6.	DISKUZE.....	97
7.	ZÁVĚR	108
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	110
9.	POUŽITÁ LITERATURA.....	111
	PŘÍLOHY	I

1. ÚVOD

Trichomonády, anaerobní bičíkovci patřící do říše Excavata, zahrnují komenzální, parazitické a několik málo volně žijících druhů (2010). Z hlediska humánní medicíny je nejvýznamnějším patogenem *Trichomonas vaginalis*, který způsobuje kosmopolitně rozšířené sexuálně přenosné onemocnění. Méně patogenní je druh *Dientamoeba fragilis* parazitující ve střevech. Naproti tomu za komenzály jsou u člověka považovány druhy *Trichomonas tenax*, *Tetratrichomonas* sp. žijící v dutině ústní (Honigberg & Burgess 1994; Kutišová *et al.* 2005) a *Pentatrichomonas hominis* z tlustého střeva (Davaine 1860; Honigberg 1990). Jejich patogenní potenciál je však stále diskutován. Parazitické druhy významné z hlediska veterinární medicíny jsou například *Tritrichomonas foetus* způsobující sexuálně přenosné onemocnění skotu (Riedmüller 1928; BonDurant & Honigberg 1994), *Histomonas meleagridis* způsobující akutní průjemové onemocnění krů'at (BonDurant & Wakenell 1994; BonDurant & Honigberg 1994), *Cochlosoma anatis* parazitující v gastrointestinálním traktu kachen (Pecka *et al.* 1996; Hampl *et al.* 2006) a *Trichomonas gallinae* postihující horní zažívací trakt ptáků (Stabler 1954; BonDurant & Honigberg 1994).

Zvř'ata žijící v těsné blízkosti člověka, jako jsou psi a kočky, bývají osídleny jak komenzálními, tak i parazitickými druhy trichomonád. Významnou trichomonádou v této skupině je *Tritrichomonas foetus* způsobující chronické průjemové onemocnění u koček. U psů byl *Tritrichomonas foetus* popsán také, nicméně jeho patogenní vliv na hostitele není znám. U koček a psů nalezneme ve střevech také *Pentatrichomonas hominis*, který je považován za komenzála s širokým hostitelským spektrem. Z dutiny ústní psů a koček jsou popsány komenzální druhy *Tetratrichomonas canistomae* (Hegner & Ratcliffe 1927a), respektive *Tetratrichomonas felistomae* (Hegner & Ratcliffe 1927b).

V mnoha zemích Evropy byl v posledních letech zaznamenán výskyt infekcí *Tritrichomonas foetus* u koček, v České republice však zatím popsán nebyl. Na základě studií z několika evropských zemí se domníváme, že *Tritrichomonas foetus* se v České republice pravděpodobně vyskytuje a z tohoto důvodu jsme se rozhodli prověřit výskyt této infekce u koček na území České republiky. V posledních deseti letech je téměř veškerý výzkum trichomonád u domácích zvířat v Evropě zaměřen právě na *Tritrichomonas foetus* u koček, avšak studium ostatních druhů je značně zatlačeno do pozadí, a zejména pak studium výskytu trichomonád žijících v ústní dutině psů a koček. *Tetratrichomonas canistomae* byl sice opakovaně diagnostikován, jeho epidemiologie je však sporadická. Ještě méně je známo o *Tetratrichomonas felistomae*.

2. CÍLE PRÁCE

Z výše uvedených důvodů jsme se rozhodli zabývat problematikou trichomonád u psů a koček hlouběji, a to s následujícími cíli:

- 1) Prokázat přítomnost *Tritrichomonas foetus* u psů a koček v České republice a stanovit potenciální rizikové faktory onemocnění.
- 2) Rozlišit druhy trichomonád přítomných v orální dutině psů a koček a získat předběžná epidemiologická data.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Trichomonády

Trichomonády patří do kmene Parabasalia, který je charakteristický přítomností parabazálního aparátu, extranukleárního dělicího vřetenka (Brugerolle 1975) a hydrogenozómů (Müller & Lindmark 1978; Čerkasov *et al.* 1978). Druhy parabasalidů byly tradičně tříděny na základě morfologie a ultrastruktury jejich cytoskeletu (Brugerolle 1976; Brugerolle 1991; Honigberg 1963). Později byl tento kmen rozdělen, díky novým morfologickým, molekulárním a fylogenetickým analýzám, do šesti tříd: Trichomonadea, Tritrichomonadea, Hypotrichomonadea, Cristamonadea, Spirotrichonymphea a Trichonymphea (Čepička *et al.* 2010).

Zástupci tříd Trichomonadea a Tritrichomonadea žijí převážně endosymbioticky či paraziticky, nejčastěji v zažívacím traktu obratlovců i bezobratlých (Honigberg 1963). Pouze několik málo zástupců těchto dvou tříd je volně žijících (Honigberg 1963; Čepička *et al.* 2010). Trichomonády diagnostikované u psů a koček patří právě do dvou výše zmíněných tříd a proto veškeré níže uvedené informace budou zaměřeny pouze na popis charakteristiky těchto dvou tříd a jejich zástupců.

3.1.1. Morfologie

K endosymbiotickému a parazitickému způsobu života jsou trichomonády přizpůsobeny svou morfologií a anaerobním metabolismem. Trichomonády mají pleomorfní buňky, obvykle hruškovitého, ovoidního nebo vřetenovitého tvaru. Trichomonády se většinou vyskytují v bičíkaté formě a některé se za určitých okolností mění na améboidní organismus nebo pseudocystu (Honigberg 1963). Buněčné tělo je kryto plazmatickou membránou, která umožňuje trichomonádám adhezi a komunikaci v prostředí hostitele. Přes plazmatickou membránu přijímají buňky trichomonád potravu endocytózou, fagocytózou nebo pinocytózou (viz Honigberg 1963; BonDurant & Honigberg 1994).

Mezi cytoplazmatické orgány patří mohutně vyvinutý Golgiho komplex, jehož cisterny tvoří spolu s žíhanými fibrilami parabazální aparát. Právě podle tohoto komplexu byl pojmenován kmen Parabasalia. Tvar parabazálního aparátu je jedním z určovacích znaků Trichomonád. Například *Trichomonas tenax* a *Tritrichomonas foetus* charakterizuje tyčovitý parabazální aparát (Brugerolle 1976) a rod *Tetratrichomonas* a *Pentatrichomonas* diskovitý parabazální aparát (viz. Brugerolle 1976; Honigberg & Brugerolle 1990; BonDurant & Honigberg 1994). Trichomonády vlastní modifikovanou mitochondrii tzv. hydrogenozóm, který byl poprvé popsán a biochemicky analyzován právě u těchto organismů (Lindmark & Muller 1973; Čerkasov *et al.* 1978). Hydrogenozóm je organela o velikosti 0,3-1,2 μm a je ohraničena dvojitou membránou, přičemž vnitřní membrána netvoří krysty. Hydrogenozóm nemá vlastní genom, všechny proteiny jsou kódovány v jádře, syntetizovány v

cytoplasmě a importovány do hydrogenozómu na základě signální sekvence (Lahti & Johnson 1991). Hlavní metabolická dráha hydrogenozómu spočívá v přeměně pyruvátu a malátu na acetát, ATP, vodík a CO₂ (Müller 1993). Mezi další funkce hydrogenozómu spadá tvorba železo-sirných (Fe-S) center (Sutak *et al.* 2004).

Významnými cytoskeletálními strukturami trichomonád jsou axostyl, pelta a kosta. Axostyl a pelta jsou složeny z mikrotubulů a tvoří dominantní opornou strukturu buňky. Proximální část axostylu je rozšířena v capitulum a částečně objímá jádro. Distální konec axostylu obvykle vyčnívá ven z buňky. U rodu *Trichomonas*, *Tetratrichomonas* a *Pentatrichomonas* se axostyl kontinuálně sužuje směrem k posteriornímu konci, u rodu *Tritrichomonas* má relativně stejnou šířku po celé délce buněčného těla a na konci tvoří špičku. Pelta nasedá na axostyl na přední straně buňky nad jádrem a zpevňuje místo odstupe bičků od bazálních tělísek (kinetozómů) (Brugerolle 1976; Benchimol 2004).

Trichomonády jsou charakterizovány třemi až pěti předními bičky a jedním zpětným bičkem, který obvykle tvoří undulující membránu. Undulující membrána umožňuje pohyb ve viskózním prostředí (obsah střeva, poševní sekret). Undulující membrána je většinou podložena silnou žíhanou fibrilou – kostou, která pravděpodobně slouží k tlumení nárazů undulující membrány. Podle způsobu žíhání se rozlišují dva typy kasty, které následně slouží jako další diagnostický znak (Čepička *et al.* 2010). Rody *Trichomonas*, *Tetratrichomonas* a *Pentatrichomonas* obsahují kostu typu B a rod *Tritrichomonas* kostu typu A (Brugerolle 1976; Čepička *et al.* 2010). Rozdíl mezi rodem *Trichomonas* a *Tritrichomonas* je i v postavení rekurentního bičku k undulující membráně, kdy v prvním případě nasedá biček z boku, tzv. lameliforní typ, v druhém nasedá na vrcholku, tzv. "rail-form typ" (Brugerolle 1976; Čepička *et al.* 2010). Zatímco undulující membrána u rodu *Trichomonas* končí ve dvou třetinách těla a biček nepokračuje volnou částí, u rodu *Tetratrichomonas* končí ve třech čtvrtinách s odstupující volnou částí zpětného bičku. U rodu *Tritrichomonas* a *Pentatrichomonas* dosahuje undulující membrána až ke konci buňky a má taktéž volnou část zpětného bičku (Brugerolle 1976; Honigberg & Brugerolle 1990).

3.1.2. Buněčný cyklus

Trichomonády mají jednoduchý vývoj, ve kterém dominuje stádium trofozoita. Trofozoiti se rozmnožují binárním dělením a mají specifický typ jaderného dělení tzv. kryptopleuromitózu, při kterém se vytváří extranukleární dělicí vřeténko a nedochází k rozpadu jaderné membrány (Brugerolle 1975; Benchimol 2004). Trichomonády tříd Trichomonadea a Tritrichomonadea mají jedno jádro lokalizované v přední části buňky. Geny jsou uspořádané do lineárních chromozomů a během replikace jsou přítomny všechny mitotické fáze (Drmota *et al.* 1997; Benchimol 2004).

Trichomonády mají charakteristický karyotyp se stabilním a haploidním počtem chromosomů. V rámci vybraných dvou tříd má relativně velký genom rod *Trichomonas* a *Tritrichomonas* (133–177 Mb), naproti tomu *Tetratrichomonas gallinarum* má genom nejmenší (86 Mb) (Zubáčová *et al.* 2008).

Za nevhodných podmínek, například snížení teploty, vytváří trichomonády pseudocysty neboli nepravé cysty, kdy jde v podstatě o internalizaci mastigontu (Honigberg 1963). Ačkoliv byla dříve pseudocysta popisována jako degenerovaná buněčná forma, v současnosti se považuje za odolnější stádium trichomonád, které může pomoci přežít nepříznivé podmínky (Pereira-Neves *et al.* 2003; Pereira-Neves & Benchimol 2009).

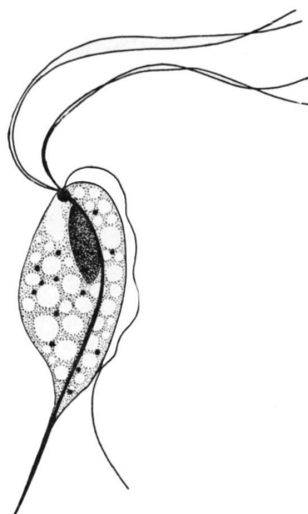
3.2. Trichomonády ústní dutiny psů a koček

3.2.1. *Tetratrichomonas canistomae*

V roce 1927 popsali Hegner a Ratcliffe z ústní dutiny psů trichomonádu, kterou pojmenovali *Trichomonas canistomae* (Hegner & Ratcliffe 1927a). Nicméně podle morfologického popisu se jedná o rod *Tetratrichomonas*, a proto byl přejmenován na *Tetratrichomonas canistomae* (Levine 1973; BonDurant & Honigberg 1994).

Tet. canistomae má tvar typických trichomonád třídy Trichomonadea. Z přední části vybíhají 4 anteriorní bičíky stejné délky, které jsou dlouhé přibližně jako tělo buňky, zatímco pátý bičík je zpětný, tvoří undulující membránu, která dosahuje ke konci těla délky buňky, a následně vybíhá ve volnou část. Průměrná délka buňky je 9 μm a průměrná šířka 3,4 μm (Hegner & Ratcliffe 1927a).

Obrázek 1: Morfologický náčrt *Tetratrichomonas canistomae* z dutiny ústní psa. Barveno hematoxylinem (Hegner & Ratcliffe 1927a).



Hegner a Ratcliffe (1927a) zkoumali 22 psů v Baltimoru, kteří byli chováni v laboratoři a byli starší od jednoho měsíce do jednoho roku. Styk psů byl umožněn jen při čistění klecí, ve kterých jinak psi žili odděleně. Tento kontakt zřejmě umožnil trichomonádám rozšířit se mezi všechny psy. Trichomonády byly získány výtěrem dutiny ústní a zejména pak okolí těch zubů, které vykazovaly známky periodontálního onemocnění (Hegner & Ratcliffe 1927a). Podobně byl diagnostikován *Tet. canistomae* u 15 psů z celkového počtu 100 ve Francii v roce 1970, kde autoři naznačili přítomnost *Tet. canistomae* v dutině ústní jako možnou příčinu gingivitid (Rousset *et al.* 1970).

V roce 2000 byl *Tet. canistomae* nalezen překvapivě také u 72 letého pacienta ve Varšavě, léčeného na revmatoidní artritidu (Grytner-Ziecina *et al.* 2000).

3.2.2. *Tetratrichomonas felistomae*

Tetratrichomonas felistomae byl poprvé nalezen v USA u dvou z osmnácti vyšetřovaných koček. Průměrná délka byla $8,3 \pm 0,98 \mu\text{m}$ a šířka $3,3 \mu\text{m}$ (Hegner & Ratcliffe 1927b). *Tet. felistomae* a *Tet. canistomae* možná patří do stejného druhu (Levine 1973). Gothe *et al.* (1992) pozoroval výskyt *Tet. felistomae* pouze u koček, které měly záněty dásní nebo trpěli na kočičí virové infekce, jako je kočičí leukemický virus (FeLV) a kočičí imunodeficientní virus (FIV) (Gothe *et al.* 1992 v Bowman *et al.* 2003).

Obrázek 2: Morfologický náčrt *Tetratrichomonas felistomae* z ústní dutiny kočky. Barveno hematoxylinem (Hegner & Ratcliffe 1927b).



3.2.3. *Trichomonas tenax*

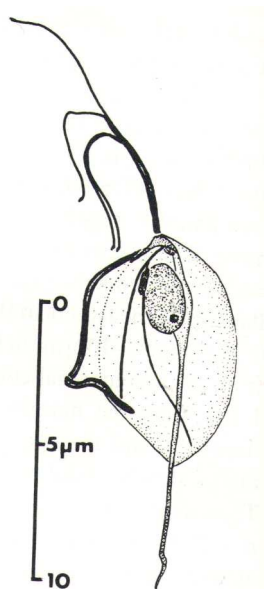
Taxonomie

Přestože *Trichomonas tenax* byl popsán z dutiny ústní člověka až v první polovině 20. století (Dobell 1939), první zmínka o tomto druhu pochází už z roku 1773, kdy byla pozorována O. F. Müllerem. V literatuře se sice vyskytují synonyma *Trichomonas buccalis* (Goodey 1917) a *Trichomonas elongata* (Steinberg 1862), ale první popis tohoto druhu publikoval až Dobell roku 1939 (viz Honigberg 1990).

Morfologie

Tvar buňky je variabilní, nejčastěji elipsoidní nebo ovoidní, délka buněčného těla se pohybuje v rozmezí 4 – 13 μm , šířka 2 – 9 μm . *T. tenax* má čtyři anteriorní bičíky, undulující membrána je kratší než tělo buňky a není přítomen volný zpětný bičík. Parabazální aparát má typický tyčovitý tvar a je situován dorzálně blízko jádra (viz Honigberg & Burgess 1994).

Obrázek 3: Morfologický náčrt *Trichomonas tenax* z ústní dutiny člověka dle preparátu barveného protargolem (převzato z Honigberg & Burgess 1994).



Geografické rozšíření a hostitelé

Přirozeným hostitelem *T. tenax* je člověk a je kosmopolitně rozšířen. Kromě člověka byl *T. tenax* popsán také u opic (Levine 1973; Wenrich 1947).

Patogenita

T. tenax je považován za komenzála, nicméně za určitých okolností může způsobovat plicní trichomoníazu (Hersh 1985). *T. tenax* byl identifikován například v pleurálním výpotku (Leterrier *et al.* 2012; Radosavljevic-Asic *et al.* 1994), empyému (Lewis *et al.* 2003) a dalších pleuropulmonálních infekcích (Mallat *et al.* 2004; Dimasuay & Rivera 2014).

Epidemiologie

Prevalence

Prevalence *T. tenax* v dutině ústní se u lidí pohybuje od 4 do 53 % a závisí na geografickém původu a věku vyšetřovaných osob (Hersh 1985). U dětí do pěti let se *T. tenax* téměř nevyskytuje. Nejčastěji jsou postiženi lidé se špatnou hygienou úst a lidé s periodontálním onemocněním (Šegović *et al.* 1993). Prevalence *T. tenax* u chronických pneumonií, bronchitid a dalších plicních onemocnění se pohybuje od 10 do 53 % (Tumka, 1956 v Kutíšová *et al.* 2005; Kazakova *et al.*, 1980 v Kutíšová *et al.* 2005; Sardis *et al.*, 1983 v Kutíšová *et al.* 2005; Šegović *et al.* 1993; Leterrier *et al.* 2012; Dimasuay & Rivera 2014).

Přenos

Přenos *T. tenax* z člověka na člověka je zprostředkován slinami, zejména kapénkovou nákazou, nebo požíváním kontaminovaných pokrmů a pitné vody (Hersh 1985). Zdrojem pleuropulmonálních infekcí je pravděpodobně dutina ústní, kdy trichomonády mohou aspirací kontaminovaných orofaryngeálních sekretů vstoupit do dolních cest dýchacích (Lewis *et al.* 2003), nebo mohou být zavedeny do dýchacího aparátu při operacích pomocí kontaminovaných inhalátorů a jiných operačních předmětů (Leterrier *et al.* 2012). Možnou příčinou pleuropulmonálních infekcí může být rovněž aktivní migrace prvoků z ústní dutiny do dolních cest dýchacích (Dimasuay & Rivera 2014). Zda je *T. tenax* pouze komenzál nebo patogen není dosud zcela objasněno (Lewis *et al.* 2003). Plicní infekce způsobené *T. tenax* jsou především hlášeny u imunosuprimovaných lidí trpících například rakovinou nebo plicními nemocemi (Hersh 1985; Lewis *et al.* 2003; Radosavljevic-Asic *et al.* 1994). Je proto pravděpodobné, že *T. tenax* může způsobit sekundární infekci, ovšem primárně onemocnění nevyvolává (Wang *et al.* 2006). K osvětlení této problematiky bude v budoucnu zapotřebí další výzkum patogenního potenciálu *T. tenax* (Dimasuay & Rivera 2014).

Diagnostika

Trichomonády z dutiny ústní jsou diagnostikovány ze sputa, bronchoalveolární laváže, nekrotické plicní tkáně a pleurálního výpotku (Radosavljevic-Asic *et al.* 1994; Mallat *et al.* 2004; Dimasuay & Rivera 2014). Hlavní diagnostickou metodou je mikroskopické vyšetření, kdy nativní preparáty jsou vyšetřeny nejlépe pod fázovým kontrastem, nebo jsou vzorky obarveny hematoxylinem či protargolem. Pro vyšší záchyt detekce *T. tenax* lze použít i kultivační diagnostické metody. V poslední době se využívá pro detekci a identifikaci druhů trichomonád molekulární diagnostika, která spočívá v amplifikaci genu 5.8S rRNA a příslušných ITS1 a ITS2 (internal transcribed spacer) regionů pomocí PCR a následné sekvenaci PCR produktu (Felleisen 1997).

Terapie

Infekce *T. tenax* v dutině ústní nejsou obvykle léčeny. Plicní trichomoniázy jsou léčeny metronidazolem (Mallat *et al.* 2004).

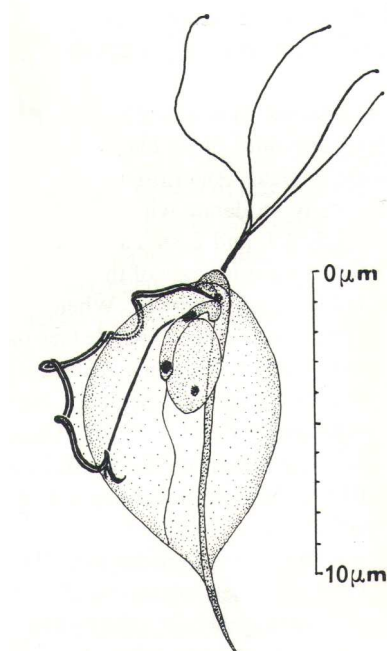
Použití molekulárních metod v diagnóze plicních trichomoniáz přispělo také k objevení nových druhů podléjících se na plicním onemocnění. Nedávno bylo objeveno, že vedle *T. tenax* může plicní trichomoniázy způsobovat i *Tetratrichomonas* sp. (Kutišová *et al.* 2005). *Tetratrichomonas* sp. byl nalezen u pacientů s chronickými respiračními problémy v Estonsku (Kutišová *et al.* 2005) a u dvou pacientů s pleurálním empyémem v Mexiku City (Lopez-Escamilla *et al.* 2013). Separované izoláty *Tetratrichomonas* sp. tvoří dvě skupiny kmenů z „dutiny ústní“ a z „průdušek“ (Kutišová *et al.* 2005). Pro tento druh tetratrichomonád byl navržen název *Tet. empyemagenae* (Lopez-Escamilla *et al.* 2013). Estonské kmeny *Tetratrichomonas* jsou velmi blízce příbuzné k *Tetratrichomonas gallinarum* z hrabavých ptáků. Ukazuje se, že *Tet. gallinarum* je zřejmě komplex druhů zahrnující několik hlavních skupin (Čepicka *et al.* 2005; Kutišová *et al.* 2005). Vzhledem k možné hrozbě trichomonád na zdraví člověka by měl být více studován význam těchto trichomonád respiračního traktu, stejně jako by měl být kladen větší důraz na molekulární identifikaci druhů při diagnostice původce dýchacích onemocnění (Leterrier *et al.* 2012; Dimasuay & Rivera 2014).

3.3. Jiné veterinárně významné druhy trichomonád z dutiny ústní

3.3.1. *Trichomonas gallinae*

Trichomonas gallinae je veterinárně významná trichomonáda rozšířená po celém světě způsobující ptačí trichomoniázu u měkkozobých ptáků (Stabler 1954). *T. gallinae* postihuje horní zažívací trakt, kde dochází k patologickým změnám od mírného zánětu sliznice až ke vzniku velkých kaseózních lézí, které mohou blokovat lumen jícnu (Perez Mesa *et al.* 1961).

Obrázek 4: Morfologický náčrt *Trichomonas gallinae* dle preparátu barveného protargolem (převzato z BonDurant & Honigberg 1994).



Rezervoárem trichomonád jsou volně žijící latentně infikovaní dospělí ptáci holuba skalního (*Columba livia*). Trichomonády jsou přenášeny přímým kontaktem vnímavých ptáků s infikovanými jedinci. Mohou se také šířit prostřednictvím kontaminovaného krmiva a pitné vody. K prvotní infekci holoubat dochází při krmení rodiči tzv. holubím mlékem (Stabler 1954). Celosvětová prevalence *T. gallinae* u řádu Columbidae se pohybuje v rozmezí od 5,6 % do 95 % (Amin *et al.* 2014).

Trichomoniáza představuje značné nebezpečí pro ohrožené ptačí druhy. Například pro dravce, kteří se nakazí konzumací infikovaných holubů nebo jiných ptáků (Krone *et al.* 2005). Mimo měkkozobé ptáky (Columbiformes) a dravce může *T. gallinae* nakazit také jiné volně žijící řády ptáků. Infekce *T. gallinae* byla zjištěna u dropů, papoušků, hrabavých ptáků a pěvců (Ecco *et al.* 2012;

Sansano-Maestre *et al.* 2009). V Austrálii je *T. gallinae* považována za běžnou infekci voliérovyh andulek (McKeon *et al.* 1997). V posledních letech je trichomoníáza popisována jako nebezpečné infekční onemocnění pěnkaovitých v Evropě. První výskyt onemocnění byl v roce 2005 ve Velké Británii, kde došlo na podzim k smrtelné epidemii pěnkaovitých (Lawson *et al.* 2011). Migrací těchto ptáků byla trichomoníáza dále rozšířena do Švédska, Norska a Finska (Neimanis *et al.* 2010). V roce 2009 byla zvýšená úmrtnost pěnkaovitých v důsledku trichomoníázy prokázána také v severním Německu, v roce 2010 ve Francii a v roce 2012 až na Slovinsku (Ganas *et al.* 2014).

3.4. Střevní trichomonády u psů a koček

Střevní protozoární infekce jsou široce rozšířeny po celém světě, zejména v rozvojových zemích. Trichomonády jsou důležitými enterobiotickými druhy hned vedle druhů *Giardia* a *Entamoeba*. Střevo psů a koček obývají převážně dva druhy trichomonád, a to *Pentatrichomonas hominis* a *Tritrichomonas foetus*. V dnešní době probíhají především studie o epidemiologii kočičí trichomoníázy způsobené *Tritrichomonas foetus*.

3.4.1. *Pentatrichomonas hominis*

Taxonomie

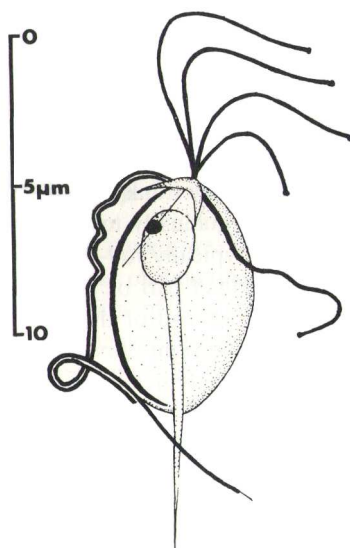
Již na počátku 20. století bylo popsáno hned několik druhů trichomonád ve střevech člověka. Mezi nejčastěji popsané patřily: *Trichomonas intestinalis* (Leuckart 1879), *Trichomonas hominis* (Davaine 1860) a *Pentatrichomonas hominis* (Davaine 1860). Na základě morfologických studií navrhl Wenrich v roce 1931 pro tyto organismy jednotný název *Pentatrichomonas hominis* (Wenrich 1931). Ze střeva různých druhů zvířat bylo popsáno, podobně jako u člověka, několik druhů trichomonád. Například *Trichomonas hominis* byl popsán u poloopic (Honigberg 1990), *Pentatrichomonas felis* u koček (Tanabe 1926), *Pentatrichomonas macropi* u klokanů a *Trichomonas microti* u hraboše polního (Wenrich & Saxe 1950). Na základě shody morfologických znaků se začalo v polovině padesátých let dvacátého století uvažovat o sjednocení názvu pro tyto organismy. V roce 1944 Wenrich navrhl, že trichomonády s pěti předními bičíky popsanými ze střeva lidí, opic, koček, psů a krys patří do stejného druhu (Wenrich 1944). Ke stejnému názoru se připojili i Kirby (1945) a Honigberg (1963) a na základě morfologických studií poloh bičíku, pely a axostylu bylo navrženo jednotné jméno pro všechny tyto intestinální prvoky: *Pentatrichomonas hominis* (Kirby 1945; Honigberg 1963).

Morfologie

Trofozoiti *P. hominis* mají typicky elipsoidní nebo hruškovitý tvar a dosahují délky 6 – 14 µm a šířky 4 – 6,5 µm. Rod *Pentatrichomonas* je charakteristický jedním zpětným a pěti předními bičíky, kdy

čtyři jsou popisovány jako anteriorní a pátý jako posteriorní, který nemusí být přítomen. Zpětný bičík tvoří undulující membránu, která je stejně dlouhá jako délka buňky trofozoita a přechází ve volnou část zpětného bičíku (viz Honigberg & Burgess 1994).

Obrázek 5: Morfologický náčrt *Pentatrichomonas hominis* dle preparátu barveného protargolem (převzato z Honigberg & Burgess 1994)

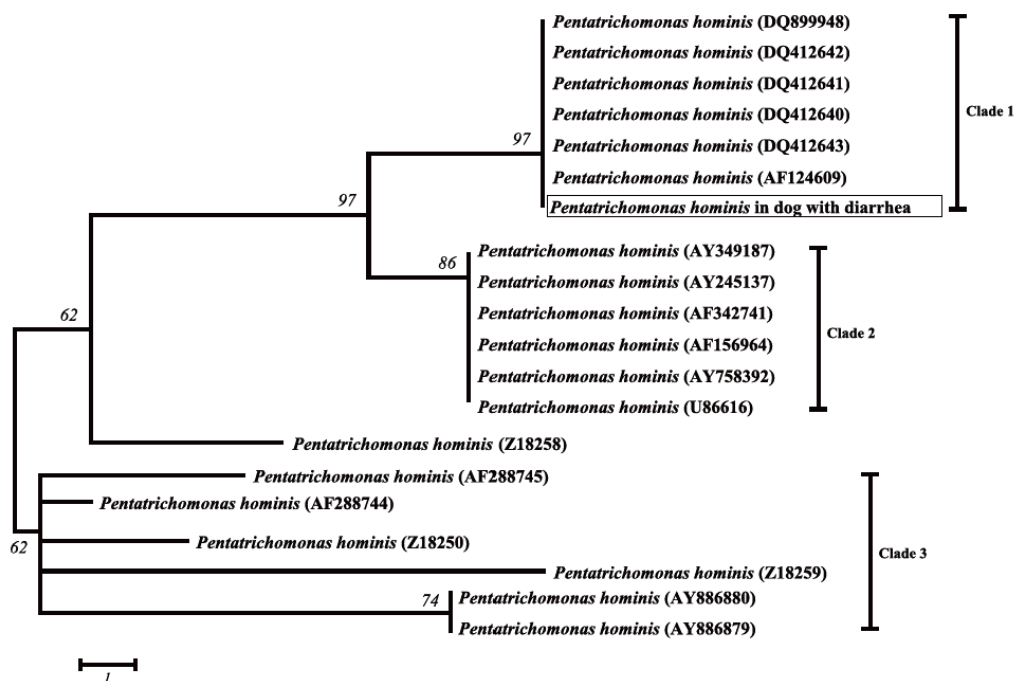


Geografické rozšíření a hostitelé

P. hominis je kosmopolitně rozšířen, ale častěji se vyskytuje zejména v teplých a vlhkých oblastech. *P. hominis* se vyznačuje širokou hostitelskou specifitou. Kromě koček, psů a lidí, obývá zažívací trakt myší, krys, křečků, prasat, koz, skotu a poloopic (Wenrich 1944; Levine 1973; Smejkalova *et al.* 2012; Dimasuay & Rivera 2013). V roce 2013 byl tento prvok poprvé izolován i ze sovy a hroznýše (Dimasuay & Rivera 2013).

Izoláty *P. hominis* lze na základě fylogenetické analýzy genů 18S rRNA řadit do tří skupin. V první skupině jsou izoláty ze zvířat (skot, kočka a pes), v druhé a třetí skupině jsou běžní lidscí komenzálové (Kim *et al.* 2010) viz obrázek 6.

Obrázek 6: Analýza sekvenční genu 18S rRNA *Pentatrichomonas hominis*. Neighbor-Joining (NJ). Délka každé větve je úměrná množství evoluční vzdálenosti mezi jednotlivými druhy. Měřítko udává 0,2 substituce (opravené) na základní pár (Kim *et al.* 2010).



Patogenita

P. hominis je považován za neškodného komenzála žijícího v distálním konci tenkého střeva, v tlustém a slepém střevu obratlovců (Honigberg 1990; Wenrich 1944). Za určitých okolností může *P. hominis* způsobit abnormality v zažívacím traktu vedoucím k průjmům (Yang *et al.* 1990; Compaoré *et al.* 2013; Mostegl *et al.* 2012; Gookin *et al.* 2005). Nejčastější příčinou je zřejmě přemnožení trofozoitů, a to zejména u nakažených dětí a lidí se sníženou imunitní odpovědí (Shaio & Chen 1989; Compaoré *et al.* 2013). V jiných případech se jedná o smíšené infekce s dalšími prvky jako například *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, nebo také s bakteriemi *Campylobacter* a *Shigella* (Chunge *et al.* 1992). V takovýchto kombinacích se mohou u dětí a novorozenců vyskytnout urputné a vyčerpávající průjmy (Yang *et al.* 1990; Chunge *et al.* 1992). Vyšší nákaza *P. hominis* u dětí než u dospělých odpovídá zřejmě nedostatečným hygienickým návykům.

Mimo gastrointestinální trakt byl *P. hominis* nalezen v exsudátu pohrudničního výpotku u ženy s fatálním systematickým lupus erythematosus (Jongwutiwes *et al.* 2000) a u jiné ženy ve vaginálních vzorcích (Crucitti *et al.* 2004). *P. hominis* byl také pozorován u skotu z předkožky býků (Walker *et al.* 2003). Experimentální studie však neprokázaly přetrvávající infekci trofozoitů v genitáliích jalovic. *P. hominis* pravděpodobně kontaminuje genitální trakt pouze vzácně (Cobo *et al.* 2007).

U koček a psů nebyly pozorovány žádné patologické změny způsobené *P. hominis*. Nicméně se předpokládá, že k navození průjmu dochází při přemnožení trofozoitů ve střevech a při infekci mladých imunitně nezralých jedinců – štěňata od 7 týdnů do 9 měsíců věku (Gookin *et al.* 2007a; Levy *et al.* 2003; Tolbert *et al.* 2012; Mostegl *et al.* 2012; Grellet *et al.* 2013). Vyšší vnímavost štěňat k infekci trichomonádami byla prokázána i experimentálně (Simic 1932 v Gookin *et al.* 2007a). Patogenní působení *P. hominis* by mohlo být závislé na koinfekce s dalšími parazity (Gookin *et al.* 2005; Gookin *et al.* 2007c; Tolbert *et al.* 2012).

Epidemiologie

Prevalence

Prevalence *P. hominis* u lidí je popisována v rozmezí od 0.1% do 30.9% v závislosti na geografické lokalizaci (viz Honigberg 1990). Zvyšující se prevalence *P. hominis* je přímo asociovaná s chudými sociálně-ekonomickými podmínkami. Díky rozšířené turistice může být *P. hominis* mnohem častěji transportován z tropického regionu do Evropy (Chomicz *et al.* 2004).

Na základě mikroskopických vyšetření a mikrobiologických kultivací se pohybovala prevalence trichomonád u psů od 0% do 30% z (Fukushima *et al.* 1990; Burrows 1967 v Grellet *et al.* 2013). Trichomonády však nebyly identifikovány molekulárními technikami a není jednoznačně známo, zda se jednalo vždy o *P. hominis*. Existuje pouze několik málo studií, ve kterých byl *P. hominis* identifikován. Ve studii z USA byl *P. hominis* zjištěn u 4 ze 104 psů (Gookin *et al.* 2007a) a v jiné studii u 18 z 19 psů (Tolbert *et al.* 2012). V jižní Koreji byly zjištěny tři případy infekce ze 14 vyšetřovaných štěňat s průjmy (Kim *et al.* 2010). Ve studii na Filipínských ostrovech byl *P. hominis* izolován ze všech sedmi vyšetřovaných psů z různých lokalit (Dimasuay & Rivera 2013). Ve Francii byl *P. hominis* nalezen u 34 z 215 štěňat (Grellet *et al.* 2013). Ve studii Gookin *et al.* (2005) byla pozorována smíšená infekce *P. hominis* s *T. foetus* u štěněte.

Na rozdíl od psů, není prevalence u koček *P. hominis* zcela jasná, a to zejména kvůli zaměňování *P. hominis* za *T. foetus*. Navíc *P. hominis* se často u koček vyskytuje společně s infekcí *T. foetus* (Gookin *et al.* 2007c). Samotné infekce jsou popsány ojediněle (Mostegl *et al.* 2012). *P. hominis* se vyskytl u 2 ze 103 vzorků trusu koček odebraných na kočičích výstavách a u 3 ze 140 vzorků trusu koček vyšetřovaných kvůli podezření na infekci *T. foetus*. V této studii nebyl *P. hominis* identifikován v žádném vzorku, který by nebyl pozitivní zároveň na *T. foetus* (Gookin *et al.* 2007c). V jiné studii byl *P. hominis* identifikován ve střevech pouze 1 ze 102 koček (Mostegl *et al.* 2012).

Přenos

P. hominis se přenáší z hostitele na hostitele fekálně orální cestou, kontaminovanou vodou a potravou, bez transformace na odolná stádia či cysty. *P. hominis* je schopný přežít ve vhodném

prostředí při teplotě od 5 °C do 31°C několik hodin až 8 dnů v podobě pseudocyst (Honigberg 1990). Bylo prokázáno, že *P. hominis* může být přenesen též hmyzem, *Musca domestica*, *Cynomia cadaverina*, a *Lucilia sericata* (Hegner 1928).

Diagnostika

P. hominis je diagnostikován z trusu, nejčastěji za použití mikroskopických technik, lze použít ale i molekulární metody. Pro detekci *P. hominis* ze vzorku trusu byly vyvinuty specifické primery na amplifikaci genu 18S rRNA *P. hominis* (Crucitti *et al.* 2004; Gookin *et al.* 2007a). Metoda, kterou lze použít při detekci trichomonád přímo ve tkáních, je chromogenní *in situ* hybridizace (CISH). Trichomonády lze zjistit použitím tří různých prób: první próba je specifická pro řád Trichomonadida (OT probe); druhá je pro čeleď Tritrichomonadidae (Tritri probe) a třetí je specifická pro *P. hominis* (Penta hom probe) (Mostegl *et al.* 2012). *P. hominis* je možné zachytit v trusu i kultivací v Diamondově mediu a kultivačním systému InPouchTM TF (Cepplecha *et al.* 2013; Gookin *et al.* 2007c; Grellet *et al.* 2013). Identifikovat trichomonády amplifikací DNA lze i z uchovaných nátěrů stolice obarvených Chlorazol Black E (CBE). V nátěrech obarvených CBE je DNA stabilní po dlouhou dobu a díky tomu lze z takového materiálu určit druhy přítomných střevních prvoků (Morimoto *et al.* 2013).

Léčba

Na léčbu *P. hominis* neexistuje žádné doporučené léčivo. U lidí jsou používány imidazolové preparáty jako je metronidazol (Chomicz *et al.* 2009; Compaoré *et al.* 2013). Metronidazol je také nejčastěji používán při léčbě průjmů u psů (Fukushima *et al.* 1990; Kim *et al.* 2010).

3.4.2. *Tritrichomonas foetus*

Tritrichomonas foetus je významný parazit způsobující sexuálně přenosné onemocnění skotu, které vede k potratům a infertilitě. Je tak příčinou vysokých ekonomických ztrát v chovu dobytka (Rae & Crews 2006). Před deseti lety byl *T. foetus* rozpoznán jako původce kočičí trichomoniázy projevující se průjmovým onemocněním tzv. „large-bowel disease“ (Levy *et al.* 2003). *T. foetus* byl také nalezen ve střevech psů (Gookin *et al.* 2005).

Taxonomie

V roce 1843 byl popsán *Tritrichomonas suis* jako komenzál z nosní dutiny a gastrointestinálního traktu prasat (Gruby & Delafond 1843). *T. foetus* byl popsán z urogenitálního traktu skotu v roce 1928 (Riedmüller 1928). V morfologii a kultivačních vlastnostech *T. suis* a *T. foetus* nebyly nalezeny žádné rozdíly a v 50. a 60. letech 20. století byly prokázány podobné fyziologické charakteristiky obou druhů, jako například sdílení stejných antigenů a cross-infekční

experimenty. Identita druhů byla definitivně prokázána až na základě dalších analýz, ultrastrukturálních a především molekulárních: náhodně amplifikovaných polymorfických DNA analýz, enzymatických homogenit a sekvenčních identit rRNA (Tachezy *et al.* 2002; Lun *et al.* 2005). Vzhledem k pravidlům stanoveným mezinárodní komisí zoologické nomenklatury by měl mít přednost název *T. suis* před *T. foetus*, což by znamenalo, že *T. foetus* je názvem neplatným. Většina studií a publikované literatury o tomto parazitu však používá název *T. foetus*. Bylo tedy navrženo potlačit starší jméno *T. suis* a nadále používat juniorské synonymum *T. foetus* jako nomen PROTECTUM (Tachezy *et al.* 2002; Šlapeta *et al.* 2012). Řešení otázek souvisejících s taxonomickou klasifikací *T. suis* je považováno za důležité, protože nákaza *T. foetus* u skotu se musí povinně hlásit v mnoha zemích. Změna jmen může vyvolat problém ve stanovení prevalence (Doi *et al.* 2013).

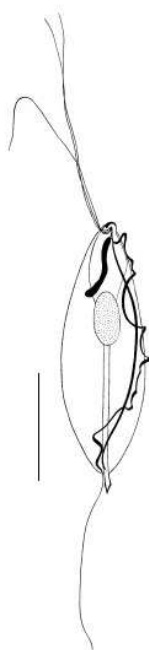
Jelikož byl *T. foetus* nalezen i u koček, vyvstala otázka, zda je izolát z kočky odlišný od izolátu *T. foetus* ze skotu, popřípadě nějak adaptovaný. Bylo zjištěno, že sekvence izolátů *T. foetus* z koček vykazují polymorfismus v oblasti ITS2 na rozdíl od sekvencí bovinních izolátů. Jedná se o jednonukleotidový polymorfismus (T u koček a C u skotu), díky kterému lze rozlišovat *T. foetus* na "kočičí genotyp" a "bovinní genotyp" (Šlapeta *et al.* 2010). Nukleotidové a aminokyselinové rozdíly mezi genotypy v cysteinové proteáze 8 (Sun *et al.* 2012) a genetické vlastnosti na základě elongačního faktoru (EF)- α genu (Reinmann *et al.* 2012) ukazují možnou adaptaci jednotlivých genotypů k hostiteli. Ve studii Stockdale a kol. (2007) byly zjištěny minimální rozdíly v infekčnosti mezi kočičím a bovinním izolátem; bovinní genotyp *T. foetus* byl schopen infikovat slepé střevo kočky, a stejně tak i kočičí genotyp *T. foetus* naočkováný do reprodukčního traktu skotu byl schopen způsobit endometritidu (Stockdale *et al.* 2007). Stockdale a kol. (2008) se domnívají, že biologické a molekulární rozdíly pozorované mezi kočičími a bovinními izoláty *T. foetus* převyšují vnitrodruhovou variabilitu. Naproti tomu schopnost genotypů *T. foetus* navodit onemocnění v opačném hostiteli ukazuje na to, že kočičí ani bovinní genotyp není zcela hostitelsky specifický (Šlapeta *et al.* 2010). Je možné, že nízká hostitelská specifita je odrazem časně molekulární diverzifikace *T. foetus* na nové genotypy. Nelze tedy vyloučit schopnost *T. foetus* nakazit nové druhy hostitelů (Profizi *et al.* 2013).

Morfologie

T. foetus má vřetenovitý tvar a měří přibližně 10 – 25 μm x 3 – 12 μm (Kirby 1951). Z anteriorní strany buňky vybíhají tři přední bičíky dlouhé 11 – 17 μm a jeden zpětný, který vytváří typickou dobře vyvinutou undulující membránu (Kirby 1951). *T. foetus* za přirozených i experimentálních podmínek (např. stresové podmínky vnějšího prostředí, snižování živin, přítomnost léků či náhlé změny teplot) tvoří pseudocysty, které nemají typickou cystovou stěnu a jsou kulovitého nebo elipsoidního tvaru s internalizovanými bičíky (Pereira-Neves *et al.* 2003). Hlavní role

pseudocysty je zřejmě krátkodobá ochrana proti nepříznivým vnějším podmínkám (Pereira-Neves *et al.* 2003).

Obrázek 7: Morfologický náčrt *Tritrichomonas foetus* dle preparátu barveného protargolem, měřítko 5 μm (Tachezy *et al.* 2002).



Geografické rozšíření a hostitelé

T. foetus se vyskytuje kosmopolitně a byl popsán z řady druhů zvířat a výjimečně i u člověka. V závislosti na druhu hostitele se *T. foetus* chová buď jako patogen nebo komenzál. U skotu *T. foetus* infikuje urogenitální trakt, kde způsobuje závažné endometritidy, u koček způsobuje chronické průjemové onemocnění. *T. foetus* se vyskytuje ve střevech psů, v nosní dutině a gastrointestinálním traktu prasat, kde jeho patogenita není prokázána (Gookin *et al.* 2005; Tachezy *et al.* 2002; Mostegl *et al.* 2011). Urogenitální infekce *T. foetus* byla zaznamenána také u velbloudů (Wernery 1991) a dalšími potenciálními hostiteli mohou být malý přežvýkavci, koně a srnčí zvěř (Levine 1973).

Skot

T. foetus způsobuje u skotu bovinní trichomoniázu - sexuálně přenosné onemocnění vedoucí k abortům a infertilitě skotu (Rae & Crews 2006). Zdrojem nákazy jsou asymptomatictí infikovaní býci, kteří mohou přenášet onemocnění po celý život. Přenos z býků na jalovice a krávy probíhá během páření. Závažnost onemocnění u krav se liší. Postupuje od mírných zánětů pochvy nebo endometritid až k akutním zánětům reprodukčního traktu. U březích krav může trichomoniáza vést k abortům, méně často k embryonálnímu úmrtí *in utero* a rozvoji pyometry s následkem infertility (Rae *et al.* 2004; Rodning *et al.* 2008). Býci jsou primárními nosiči a mohou znovu infikovat již

vyléčenou krávu. *T. fetus* může perzistovat v endemickém stádu bez identifikace, což má za následek značný ekonomický dopad na dobytčí farmy (Rodning *et al.* 2008).

Diagnostika bovinní trichomoniázy je založena na mikroskopické identifikaci parazita po kultivaci výtěrů z předkožky býků a vaginálních sekretů krav. Pro kultivaci se používá Diamondovo médium nebo komerčně dostupný kultivační systém InPouch™ (Lun *et al.* 2000; McMillen & Lew 2006). K potvrzení identifikace kultivovaných organismů a vyloučení možné kontaminace ostatními druhy trichomonád se používá PCR diagnostika na bázi amplifikace 5.8S rRNA, ITS-1 a ITS-2 regionu (Felleisen 1997).

Umělá inseminace rozšířená v posledních desetiletích vedla téměř k eradikaci bovinní trichomoniázy ve střední a západní Evropě. V zemích, kde jsou rozsáhlá stáda množena přirozeným pohlavním stykem, je infekce *T. fetus* stále rozšířena (Rae *et al.* 2004; Rodning *et al.* 2008; Szonyi *et al.* 2012). Například v USA kontrolu nad infekcí stěhuje i neexistence účinných léčebných látek, které by byly povoleny pro terapii u užitkového dobytka. Dovoz zvířat z těchto oblastí představuje potenciální riziko vzniku epidemie i v regionech, kde byla trichomoniáza skotu potlačena a považuje se za důležité povinně testovat býky z dovozu (Bernasconi *et al.* 2014).

V současnosti se pracuje na vývoji imunoprofylaxe (Cobo *et al.* 2009). Důležitá je prevence, jako je použití umělé inseminace, utrácení nakažených zvířat, opakovaná kontrola býčích spermat a výměna starších býků za mladší.

Prasata

T. suis se vyskytuje v nosní dutině, žaludku, tenkém, tlustém a slepém střevě prasat. V první polovině dvacátého století byl *T. suis* považován za původce atrofické rýmy prasat (Switzer 1951 v Lun *et al.* 2005). Další studie však nepotvrdily kauzální souvislost infekcí trichomonád s tímto prasečím onemocněním a později byla identifikována jiná etiologie atrofické rýmy. Prasečí trichomonády se začaly považovat za neškodné symbionty nazální dutiny a střevního traktu. Nicméně nedávná studie poukázala na možnost fakultativní patogenity *T. suis* v tlustém střevě prasat (Mostegl *et al.* 2011).

Člověk

Infekce *T. fetus* byla identifikována ve dvou případech u imunosuprimovaných lidí (Okamoto *et al.* 1998; Duboucher *et al.* 2006). V prvním případě se jednalo o pacienta s transplantací periferních kmenových buněk, u kterého se vyvinula meningoencefalitida asociovaná s přítomností *T. fetus* (Okamoto *et al.* 1998). Ve druhém případě byl *T. fetus* identifikován v bronchoalveolární laváži při zápalu plic u pacienta, který byl infikován virem HIV (Duboucher *et al.* 2006).

3.4.3. Trichomoniáza psů

Trichomonády byly ojediněle nalezeny u psů s průjmy již od počátku devatenáctého století (Simic 1932 v Gookin *et al.* 2007a). Teprve na počátku 21. století se zjistilo, že na infekci se podílejí dva druhy trichomonád. Pozorovanými trichomonádami jsou *Tritrichomonas foetus* a *Pentatrichomonas hominis* (Gookin *et al.* 2005). Prevalence a patogenita těchto prvoků v psí populaci však stále zůstává málo známá. Poslední studie ale ukazují, že *P. hominis* se u psů vyskytuje častěji než *T. foetus* (Gookin *et al.* 2007a; Kim *et al.* 2010; Tolbert *et al.* 2012; Grellet *et al.* 2013).

T. foetus byl poprvé identifikován v USA u jednoho štěněte s průjmem (Gookin *et al.* 2005). Následně byl zjištěn u 2 z 38 vyšetřovaných psů (Tolbert *et al.* 2012). Ve Francii zachytili z 215 psů pouze *P. hominis* (Grellet *et al.* 2013). Kromě dvou dospělých jedinců (Tolbert *et al.* 2012) tvořila vyšetřovaná populace pouze štěňata (Gookin *et al.* 2005).

Při identifikaci přítomnosti *T. foetus* ve střevech psů většina jedinců trpěla průjmy. V současné době není známo, zda *T. foetus* je skutečným patogenním agens, nebo zda je jeho patogenita spojena s koinfekcí *P. hominis* a dalšími střevními parazity. Ve většině popsáných případů u psů, kde byl nalezen *T. foetus*, byli diagnostikováni i další enteroparazité – *Toxocara* spp., *Giardia* sp., *Cryptosporidium* sp, *Coccidia* spp., *Isospora canis*; ale také bakterie – *Clostridium* sp. či viry – *Parvovirus* (Gookin *et al.* 2005; Tolbert *et al.* 2012).

Zmíněné případy nákazy *T. foetus* byly zjištěny na základě kultivace a molekulární identifikace (Tolbert *et al.* 2012; Gookin *et al.* 2005). Léčba infekce *T. foetus* u psů není popsána, pouze je zmíněna možnost podávání metronidazolu, který je běžným lékem proti anaerobním prvokům (Gookin *et al.* 2005).

3.4.4. Trichomoniáza u koček

Taxonomie

Kočí trichomoniáza byla poprvé popsána již na počátku 20. století, kdy byly ve střevech koček nalezeny trichomonády s 3 – 5 předními bičíky. Na základě morfologie byly tyto trichomonády považovány za jeden druh a nezávisle na sobě byly několikrát popsány a pojmenovány jako *Trichomonas felis* (Da Cunha & Muniz 1922 v Pinto 1925), *Pentatrichomonas felis* (Tanabe 1926) a *Trichomonas hominis* (Davaine 1860). Během dalších let bylo zjištěno, že jsou tyto trichomonády morfologicky shodné s *Pentatrichomonas hominis*, již identifikovanou trichomonádou nejen u člověka ale i u dalších savců. Na konci 20. století byl *P. hominis* popsán jako původce chronických průjmů u koček (Romatowski 1996, 2000 v Gookin *et al.* 2004). Nicméně molekulární analýzy genu 18S rRNA izolátů trichomonád odebraných z přirozeně nakažených koček odhalily jako původce *Tritrichomonas foetus* (Levy *et al.* 2001). Patogenita *T. foetus* u koček byla následně prokázána

i experimentálně, kdy byly vyvolány signifikantní klinické a histologické změny u koček naočkovaných izoláty *T. foetus* odebraných z přirozeně nakažených koťat (Gookin *et al.* 2001). Vysvětlení přítomnosti 3 – 5 bičíkatých trichomonád přinesly až další molekulární analýzy, které odhalily ve střevech koček také přítomnost *P. hominis* (Levy *et al.* 2003). Roku 2003 byl *T. foetus* definitivně prokázán jako patogenní agens kočičí trichomoniázy (Levy *et al.* 2003).

Epidemiologie

I přesto, že od doby identifikace původce onemocnění v roce 2003 byla studována prevalence a epidemiologie kočičí trichomoniázy, řada otázek zůstává nezodpovězena - nejasná je otázka původu infekce, která byla zkoumána přenosem *T. foetus* ze skotu na kočky a opačně. U infikovaných koček bovinním genotypem a u infikovaných krav kočičím izolátem bylo vyvoláno onemocnění, ale s mírnějšími klinickými příznaky než infekce původním genotypem (Stockdale *et al.* 2007; Stockdale *et al.* 2008). Jelikož nebyla nalezena žádná asociace mezi onemocněním u koček žijících v blízkosti hospodářství (Gookin *et al.* 2004), přímý přenos ze skotu na kočky není považován za pravděpodobný zdroj kočičí infekce. Možnost nákazy koček od infikovaných prasat nebyla experimentálně zkoumána.

Zjišťuje se, že infekce koček *T. foetus* je poměrně rozšířená. Není však jasné, zda častější diagnóza parazita u koček je následkem vyššího povědomí o onemocnění mezi veterináři, nebo zda se jedná o nově se objevující nákazu šířící se převozem a prodejem zvířat (Bissett *et al.* 2008; Stockdale *et al.* 2009; Bell *et al.* 2010). Vznik nové nákazy by mohla podporovat i hypotéza, že *T. foetus* prochází diverzifikací vedoucí ke zvýšené hostitelské specifitě (Šlapeta *et al.* 2010).

Přenos

T. foetus se přenáší fekálně-orální cestou (Gookin *et al.* 2001) a to buď přímým kontaktem s čerstvým infikovaným trusem, nebo nepřímo trusem kontaminovaným prostředím, jako je podestýlka či potrava koček (Hale *et al.* 2009). Možnost nepřímého přenosu potvrdily studie o odolnosti trofozoitů *T. foetus* mimo hostitele. Při pokojové teplotě přežívá parazit ve vlhkém trusu až sedm dní (Hale *et al.* 2009), v potravě koček až pět dnů (Van der Saag *et al.* 2011), ve vodě či moči více než 30 minut (Rosypal *et al.* 2012). *T. foetus* je dokonce schopen projít zažívacím traktem slimáků. Živí trofozoité byli nalezeni v 100% (5/5) a 83% (5/6) slimáků rodu *Limacus maximus* a *Limacus flavus* nakrmených kočičím krmivem infikovaným 10^6 g^{-1} *T. foetus* (Van der Saag *et al.* 2011). V nepříznivých podmínkách přežívá *T. foetus* díky transformaci na pseudocysty (Pereira-Neves & Benchimol 2009).

Rizikové faktory nákazy

V dnešní době je diskutována souvislost kočičí trichomoniázy s věkem, čistokrevností a způsobem chovu. Není ale doposud zcela prokázáno, zda tyto faktory skutečně ovlivňují nákazu *T. foetus*.

Věk

Ve většině studií byl *T. foetus* identifikován především u koťat do jednoho roku (Gunn-Moore *et al.* 2007; Bell *et al.* 2010; Burgener *et al.* 2009), avšak *T. foetus* byl pozorován i u starších koček (Holliday *et al.* 2009; Xenoulis *et al.* 2010; Gray *et al.* 2010). Podle dat není jasné, zda *T. foetus* je schopen nakazit všechny věkové kategorie koček nebo zda infikuje pouze koťata, ve kterých se infekce drží až do vyššího věku.

Čistokrevnost chovu

Ukazuje se, že *T. foetus* napadá častěji čistokrevné kočky než kočky křížené (Gunn-Moore *et al.* 2007; Burgener *et al.* 2009; Stockdale *et al.* 2009; Frey *et al.* 2009; Bell *et al.* 2010). Ve většině případů tvoří čistokrevné kočky více jak polovinu infikovaných koček (Gunn-Moore *et al.* 2007; Hosein *et al.* 2013; Burgener *et al.* 2009; Bell *et al.* 2010). Například v USA byl *T. foetus* diagnostikován u 30,8 % ze 117 vyšetřených čistokrevných koček a pouze u 9,8 % ze 173 vyšetřených křížených koček, žijících venku (Gookin *et al.* 2004; Stockdale *et al.* 2009). Nebylo ale jasné, zda častější detekce *T. foetus* u čistokrevných koček nebyla spojena pouze s lepším rozpoznáváním abnormální stolice v kočičích záchodcích a tudíž s jejich častějším vyšetřením (Bell *et al.* 2010). Nicméně při vyšetření 100 křížených venkovních koček v USA *T. foetus* infekce nalezena nebyla (Gookin *et al.* 1999). Veškeré dosavadní údaje tedy podporují spíše tvrzení, že *T. foetus* infikuje častěji čistokrevné kočky žijící pouze v domácnosti.

Není vyloučeno, že některá plemena jsou k infekci *T. foetus* více náchylná (Bell *et al.* 2010). Mezi nejčastěji nakažená plemena patří Siamská a Bengálská kočka (Gunn-Moore *et al.* 2007; Tysnes *et al.* 2011), Pixie-Bobtail, Ruská modrá (Bell *et al.* 2010), Norská lesní kočka (Kuehner *et al.* 2011; Profizi *et al.* 2013), Mainská mývalí kočka (Profizi *et al.* 2013; Tysnes *et al.* 2011) a Angorská kočka (Tysnes *et al.* 2011).

Způsob chovu

Nález 32 % koček pozitivních na *T. foetus* ze 74 nečistokrevných koček s průjmem žijících společně v jednom útulku v Itálii (Holliday *et al.* 2009) napovídá dalšímu diskutovanému rizikovému faktoru kočičí trichomoniázy a to společné ubytování tzv. multicat housing. Multicat housing je výraz zavedený pro chov koček ve velkých počtech na jednom místě (například útulky, záchrané stanice, ale i čistokrevné chovy koček), kde se kočky chovají po 5-ti a více najednou (Gookin *et al.* 1999;

Foster *et al.* 2004). Vyšší hustota koček v chovech a ubytování přispívá velkou měrou k přenosu infekce (Gookin *et al.* 2004). Toto pozorování vyplývá i z dalších studií, kdy například z 27 infikovaných koček jich 25 pocházelo od velkochovatelů ve Švýcarsku (Burgener *et al.* 2009), stejně jako 12 pozitivních ze 13 koček pocházelo z takovýchto chovů v Austrálii (Bell *et al.* 2010). Už v roce 1999 Gookin *et al.* vyzorovali u 32 pozitivních koček, že 30 patří do velkých chovů nebo záchranných stanic (Gookin *et al.* 1999). Riziko nákazy ve výše zmíněných chovech je pravděpodobně způsobeno tím, že *T. foetus* netvoří žádné odolné cysty a mnohem lépe se přenáší úzkým kontaktem mezi kočkami žijícími ve velké hustotě v jednom chovu. Prostředníkem těsného kontaktu by mohly být kočičí záchodky, které se vyskytují ve všech chovech a ubytovacích zařízeních a všechny kočky jsou nuceny je používat (Gookin *et al.* 2004; Gunn-Moore *et al.* 2007; Burgener *et al.* 2009; Xenoulis *et al.* 2010). Tuto hypotézu podporuje vysoká prevalence *T. foetus* mezi kočkami čistokrevnými ale i kříženými žijícími ve velkých chovech a záchranných stanicích, kde kočky využívají stejné záchodky (Gookin *et al.* 2004; Gunn-Moore *et al.* 2007; Hale *et al.* 2009; Holliday *et al.* 2009; Van der Saag *et al.* 2011; Rosypal *et al.* 2012). Nicméně signifikantní souvislost s infekčním onemocněním a používáním kočičích toalet se zatím neprokázala (Gookin *et al.* 2004).

Přenos infekce ve velkých chovech probíhá i přes krmné misky a kočičí hračky. *T. foetus* by se mohl rozšiřovat i vzájemnou péčí koček o srst (Bell *et al.* 2010).

Další rizikové faktory

Pohlavní predispozice mezi infikovanými kočkami byla pozorována pouze v jedné studii, kde samci koťat patřili mezi častěji nakažené než samice (Gray *et al.* 2010). Byly zkoumány potenciální rizikové faktory životního prostředí jako krmivo, voda nebo styk s jinými zvířaty. Hosein *et al.* (2013) ve své studii poukázal na zvýšenou šanci nákazy kočičí trichomoniázou u jedinců krmených syrovým masem a u jedinců účastnících se výstav. V jiných studiích ale nebyly prokázány žádné souvislosti mezi infekcí a druhem potravy, zdrojem vody, přítomností jiných domácích zvířat či geografickou distribucí chovu (Gookin *et al.* 2004; Kuehner *et al.* 2011; Tysnes *et al.* 2011; Profizi *et al.* 2013). Dále nebyla prokázána žádná významná sezónnost výskytu případů (Bell *et al.* 2010).

Prevalence a geografická distribuce

Kočičí trichomoniáza je považována za kosmopolitně rozšířené onemocnění. Prevalence *T. foetus* mezi kočkami byla pozorována v poměrně širokém rozmezí od 0 do 82 %.

Severní Amerika

Na mezinárodní výstavě v USA bylo 36 ze 117 (30,8 %) testovaných čistokrevných koček pozitivních na *T. foetus*, což bylo 28 testovaných chovů z 89 (Gookin *et al.* 2004). Při vyšetření 173 domácích koček z různých veterinárních klinik po celých Spojených státech se zjistilo, že *T. foetus* je přítomen u 9,8 % koček této populace (Stockdale *et al.* 2009). V Jižním Ontariu bylo dále

diagnostikováno 0,7 % koček ze 140 jedinců pocházejících z veterinární kliniky Guelph, 0 % ze 46 vyšetřovaných koček v záchranné stanici v Guelph a 23,6 % pozitivních jedinců z 55 koček na kočičích výstavách (Hosein *et al.* 2013).

Evropa

T. foetus je poměrně hojně rozšířen i v Evropě. Poprvé byl diagnostikován u koťat plemene Ragdoll s chronickými průjmy ve Velké Británii v roce 2006 (Mardell & Sparkes 2006). Další studie prokázala *T. foetus* v trusu u 14,4 % ze 111 vyšetřovaných britských koček trpících chronickými průjmy (Gunn-Moore *et al.* 2007). Ve Francii byla zjištěna prevalence 14,3 % ze 140 čistokrevných koček (Profizi *et al.* 2013). V Norsku byl nejprve *T. foetus* nalezen u tří koček s chronickými průjmy pocházející z jednoho chovu (Dahlgren *et al.* 2007) a posléze studie u 52 koček z kočičích výstav zjistila 21 % prevalenci *T. foetus* (Tysnes *et al.* 2011). Prevalence *T. foetus* u čistokrevných koček v Německu byla studována v roce 2011 a činila 15,7 % z 290 koček (Kuehner *et al.* 2011). V roce 2009 v Itálii bylo zjištěno, že na trichomoniázu trpí poměrně vysoké procento koček ze záchranné stanice - až 32,4 % ze 74 koček (Holliday *et al.* 2009). Ve stejném roce také švýcarští vědci odhalili přítomnost 24,4 % a 26 % pozitivních koček na *T. foetus* především mezi čistokrevnými kočkami (Frey *et al.* 2009; Burgener *et al.* 2009). V Nizozemsku bylo zjištěno, že z 53 křížených a 47 čistokrevných koček bylo pozitivních na *T. foetus* 1,9 % respektive 4,3 % (Van Doorn *et al.*, 2009 v Tysnes *et al.* 2011). V roce 2010 byl identifikován *T. foetus* také ve 20% z celkového počtu 30 koček v Řecku (Xenoulis *et al.* 2010).

Austrálie, Nový Zéland a Jižní Korea

V roce 2008 byl *T. foetus* diagnostikován u 16 koček z 23 v Austrálii (Bissett *et al.* 2008). O rok později se nepodařilo prokázat *T. foetus* u žádné kočky ze 134 chovů a útulků ze čtyř různých australských států (Bissett *et al.* 2009). Až opět v roce 2010 se objevilo onemocnění u 38 australských koček (Bell *et al.* 2010). Na Novém Zélandu bylo zaznamenáno 18 nakažených z 22 vyšetřených koček pocházejících z 12 chovů (Kingsbury *et al.* 2010). Z asijského kontinentu jsou zatím hlášeny pouze tři případy infekce *T. foetus* u koček v Koreji (Lim *et al.* 2010) a 8,8% pozitivních nálezů ze 147 vyšetřených koček v Japonsku (Doi *et al.* 2012).

Patogeneze

Není zcela jasné, jakým způsobem *T. foetus* ve střevě parazituje a jak se podílí na vzniku klinických příznaků. Kočičí trichomoniáza by mohla vznikat na základě mnoha faktorů souvisejících se střevními koinfekcemi a predispozičními faktory hostitele (Gookin *et al.* 2001; Bissett *et al.* 2008; Stockdale *et al.* 2009; Hosein *et al.* 2013).

Patologické nálezy

T. foetus kolonizuje střevo zejména ileum, slepé a tlusté střevo a konečník (Gookin *et al.* 2001; Stockdale *et al.* 2008). Výjimečně je pozorován i v duodenu a jejunu u koček s chronickými vodnatými průjmy. Trichomonády se nejčastěji sdružují v sekreci epitelů blízko povrchu sliznice a nejméně v lumenu střevních krypt (Gookin *et al.* 2001; Yaeger & Gookin 2005). Na histologickém vyšetření byly popsány případy s projevy od mírného eozinofilního zánětu s petechiemi na povrchu sliznice, až po těžké lymfoplazmatické a neutrofilní kolitidy (Mostegl *et al.* 2012). Krypty střevního epitelu mohou vykazovat hypertrofii, mikroabscesy, hyperplazii a ztrátu pohárkových buněk. Mohou se objevit multifokální slizniční ulcerace a transmurální zánět vedoucí k malabsorpci (Yaeger & Gookin 2005; Mostegl *et al.* 2012). U jediné popsané infekce *T. foetus* genitálního traktu koček byla zjištěna endometritida a pyometra. Došlo k tomu u kočky žijící ve společném chovu s dalšími kočkami, které měly trus pozitivní na *T. foetus*. Při ovariohysterektomii byli trofozoiti identifikováni v tekutině uterinních rohů. Jelikož byla nákaza doprovázena infekcí *Streptococcus canis*, nebylo jasné, který z patogenů pyometru způsobil. Nebylo zjištěno, zda *T. foetus* byl přenesen sexuálně. Trus postižené kočky byl negativní na přítomnost parazita (Dahlgren *et al.* 2007). Žádné další případy trichomonád infikujících reprodukční trakt koček nebyly pozorovány. Mimo jiné, při studiu 44 koček a 22 kocourů z 33 chovných stanic, ze kterých bylo 22 chovů pozitivních na *T. foetus*, nebyl nalezen žádný efekt nákazy *T. foetus* na úspěšnost chovů nebo počet narozených koťat (Gray *et al.* 2010).

Mechanismy patogenity

Mechanismy patogenity kočičí střevní trichomonázy nejsou zcela objasněny. U pohlavní choroby skotu jsou za nejvýznamnější mechanismy patogenity považovány rychlost namnožení trofozoitů *T. foetus* v hostiteli a sekrece hydrolytických enzymů zahrnující cysteinové proteázy, glykosidázy a neurominidázy (BonDurant & Honigberg 1994). Dalším uváděným virulentním faktorem při infekci skotu je přilnutí na epiteliální vaginální sliznici pomocí „filopodia-like protrusions“ a tkáňová invaze (Felleisen 1999; Šlapeta *et al.* 2010). Nové studie na bovinních izolátech *T. foetus* ukazují, že volné bičíkaté formy a pseudocysty *T. foetus* jsou schopny améboidní transformace při interakci s MDCK buňkami (buněčná linie ledvinového epitelu psa) (Pereira-Neves *et al.* 2012). V současné době se proto někteří autoři domnívají, že by mohl *T. foetus* adherovat na střevní sliznici také u koček. Navíc vzhledem k nálezu *T. foetus* v hlubších vrstvách sliznice tlustého střeva u dvou koček a ulceracím a erozím pozorovaných na mukóze střevní sliznice koček se předpokládá, že *T. foetus* je také schopen invadovat do stěny sliznice střeva (Yaeger & Gookin 2005). Trofozoité *T. foetus* se u koček nalézají převážně v těsné blízkosti slizničního povrchu a tak by mohli snadněji napadat epitel stěn tlustého střeva, stejně jako u skotu napadá vaginální sliznici (Felleisen 1999; Yaeger & Gookin 2005; Midlej *et al.* 2009). Při pokusech s různými kočičími izoláty *T. foetus* trofozoité adherovali na prasečí jednovrstevnou střevní buněčnou kulturu IPEC-J2 (Tolbert *et al.*

2013). Trichomonády při adherenci vytvářely většinou nepravidelné shluky trofozoitů podél celého epitelu kolonu (Yaeger & Gookin 2005; Tolbert *et al.* 2013). Schopnost *T. foetus* adherovat na epitel je však otázkou, neboť nebyly evidovány žádné amoeboidní transformace *T. foetus* jako k tomu dochází u *T. vaginalis* (Honigberg & Burgess 1994).

Role sekrece hydrolytických enzymů v patogenezi *T. foetus* u koček není zatím příliš studována. Nicméně se někteří autoři domnívají, že objasnění genetických a funkčních různorodostí proteáz mezi kočičími a bovinními izoláty by mohlo pomoci v porozumění patogenese kočičí trichomoniázy (Šlapeta *et al.* 2012). Rozdílná virulence izolátů *T. foetus* u skotu a koček by mohla spočívat v záměně serinu v cysteinové proteáze CP8 *T. foetus* ze skotu za arginin v CP8 kočičího izolátu *T. foetus* (Šlapeta *et al.* 2012).

Rozdílná virulence u různých izolátů *T. foetus* ze skotu byla jasně prokázána (Kulda & Honigberg 1969). Lze proto předpokládat, že i kmeny *T. foetus* izolované z koček se mohou lišit svojí virulencí a v důsledku způsobovat výraznější či méně výrazné klinické příznaky (Gookin *et al.* 2007b).

Mikroflóra

Endogenní bakteriální flóra tlustého střeva může mít vliv na střevní trichomonády, a tím ovlivňovat průběh choroby (Foster *et al.* 2004; Payne & Artzer 2009). Trichomonády jsou závislé na esenciálních nutričních produktech bakteriální flóry a hostitelských sekretech, a tak ovlivňují stávající složení střevní mikroflóry (Gookin *et al.* 1999). Například lidský parazit *T. vaginalis* potlačuje populaci *Lactobacillus* spp., zvyšuje pH a napomáhá tak množení anaerobních bakterií (Petrin *et al.* 1998). Možný vliv bakteriální mikroflóry na patogenitu *T. foetus* u koček podporují například různé reakce klinických příznaků kočičí trichomoniázy na léčbu variabilními antibiotiky (Gookin *et al.* 1999; Foster *et al.* 2004).

Koinfekce

Infekce střev jinými střevními parazity zřejmě trichomoniáze nepředchází (Gookin *et al.* 2004; Kuehner *et al.* 2011). Nicméně *T. foetus* se vyskytuje ve střevech s jinými parazity poměrně často. V Německu dosahovala koinfekce u *T. foetus*-infikovaných koček až 36% (Kuehner *et al.* 2011). Nálezy zahrnují *Pentatrichomonas hominis* (Gookin *et al.* 2007c; Levy *et al.* 2003), *Giardia* 54% a *Toxocara* a *Eucoleus* 15% (Bell *et al.* 2010; Burgener *et al.* 2009).

Imunitní odpověď hostitele

Stav imunitního systému přispívá ke zvýšené citlivosti koček k infekci. Vyšší riziko nákazy *T. foetus* je u mladých koček s nezralým imunitním systémem. U dospělých koček se zralým imunitním systémem se proto předpokládalo, že vliv na onemocnění *T. foetus* by mohlo mít dlouhodobé snížení aktivity jejich zdravého imunitního systému vlivem jiných nemocí: například vystavované kočky trpí

častými očními, respiračními či kožními onemocněními (Gookin *et al.* 2004; Stockdale *et al.* 2009). Nicméně při pokusech s navozením imunosuprese prenidazolem po 26 dní se infekce *T. foetus* u koček nezhoršila a nenalezlo se ani žádné spojení s nákazou parazita u imunosuprimovaných zvířat jako je kočičí leukemický virus (FeLV) a kočičí imunodeficientní virus (FIV) (Gookin *et al.* 2001).

Příznaky

Střevní trichomoniáza koček je chronická infekce, která se většinou projevuje průjmy. Mnohdy se ale onemocnění nemusí projevit vůbec a kočka je asymptomatickým nosičem (Bell *et al.* 2010; Hale *et al.* 2009; Stockdale *et al.* 2008). Průjmy mohou být podle okolností různě těžké. Mohou se vyskytnout průjmy se slábnoucím průběhem, intermitentní průjmy a zvýšení objemu stolice (Gookin *et al.* 1999; Foster *et al.* 2004; Yaeger & Gookin 2005). Průjmy mohou být mírné až akutní, řídké až vodnaté, doprovázeny čerstvou krví, hlenem, odloupanou sliznicí a charakteristickým zápachem (Burgener *et al.* 2009), nadměrným hlenem, dále pak zvyšující se frekvencí kálení či fekální inkontinence (Bell *et al.* 2010). Těžké případy mohou vykazovat výrazný zánět anální oblasti, otok, zarudnutí, bolestivost či dokonce výhřez konečníku (Burgener *et al.* 2009). Výskyt takovýchto průjmů je ale spíše výjimkou a bývají pozorovány převážně v akutních fázích.

Trendem kočičí trichomoniázy je kolísání intenzity průjmů, případně jeho úplné vymizení v průběhu času, s trvalou prezencí trichomonád ve střevech (Foster *et al.* 2004). Například u některých nakažených koček perzistovaly průjmy až 2 roky; infekce může také přetrvávat celý život pouze s občasnými průjmy (Foster *et al.* 2004). Takovýto asymptomatický nosiči jsou zdrojem nákazy pro ostatní kočky (Foster *et al.* 2004; Tolbert & Gookin 2009). Zdá se, že starší kočky jsou většinou bezpříznakovými nosiči (Foster *et al.* 2004; Tolbert & Gookin 2009; Gray *et al.* 2010; Xenoulis *et al.* 2010), nicméně někdy se u nich průjmy objevit mohou (Kuehner *et al.* 2011). Hodnocení příznaků u starších koček ztěžuje fakt, že se na *T. foetus* infekci testují převážně mladí jedinci s průjmy.

Průjmové infekce byly zaznamenány v 77 % u australských koček (Bell *et al.* 2010), přítomnost průjmu v minulosti u 61% německých koček (Kuehner *et al.* 2011). Kuehner *et al.* (2011) prokázala spojitost infekce *T. foetus* s průjmy. Nákazy souvisely s abnormálním trusem v den odběru a s průjmovou minulostí u odebíraných koček (Kuehner *et al.* 2011). Stejně tak v dalších studiích většina koček v době odběru nebo v minulosti měly průjmy (Stockdale *et al.* 2009; Xenoulis *et al.* 2013). Jako kontrast k řadě studií (Kuehner *et al.* 2011; Gookin *et al.* 2001; Gookin *et al.* 2006; Bissett *et al.* 2008) existuje studie, kde nebyla zjištěna žádná souvislost mezi přítomností *T. foetus* a průjmem v době odběru nebo přítomností průjmu v posledních 6-ti měsících (Vermeulen 2009; Xenoulis *et al.* 2013; Gray *et al.* 2010; Hosein *et al.* 2013). V problematice prokazatelnosti průjmu jako hlavního příznaku kočičí trichomoniázy hraje důležitou roli fakt, že je snazší nalézt *T. foetus* u jedinců s průjmy, protože asymptotičtí a starší jedinci nejsou zpravidla testováni (Vermeulen 2009).

Situaci dále komplikuje fakt, že přítomnost průjmů u koček je zřejmě multifaktoriální jev (Hosein *et al.* 2013). Stresující události, jako např. výstavy koček, mohou u infikovaných koček vyvolat průjmy (Foster *et al.* 2004). Bylo pozorováno, že značné procento infikovaných koček mělo abnormální konzistenci stolice v den výstavy, přičemž nemělo žádné problémy v minulosti (Kuehner *et al.* 2011). Někdy se mohou průjmy dostavit u infikovaných koček koinfikovaných dalšími endogenními parazity ve střevech. Nicméně asociace průjmů s koinfekcí parazitů potvrzena nebyla (Kuehner *et al.* 2011; Gookin *et al.* 2004; Stockdale *et al.* 2009; Burgener *et al.* 2009). Jediné zhoršení příznaků a nárůst průjmu byl pozorován u 4 koček nakažených *Cryptosporidium* spp. (Gookin *et al.* 2001).

Nakažené kočky kromě průjmů zřídka vykazují jiné příznaky onemocnění. V několika málo případech byl pozorován také výskyt zvracení, ztráta hmotnosti, nadýmání a tenezmus (Bell *et al.* 2010; Burgener *et al.* 2009; Gookin *et al.* 2001; Kuehner *et al.* 2011). Pouze Bell pozoroval špatnou kondici u 46 % nakažených koček (Bell *et al.* 2010).

Diagnostika

T. foetus není rutinně diagnostikován při parazitologickém vyšetření. V současné době mezi nejspolehlivější diagnostické metody patří komerčně vyráběný kultivační systém InPouch™ TF (kočičí) (Gookin *et al.* 2003) a nested PCR (Gookin *et al.* 2002; Grahn *et al.* 2005; Frey *et al.* 2009) či propojení obou metod (Vermeulen 2009). Mezi další metody diagnostiky patří světelná mikroskopie přímého roztěru trusu (Gookin *et al.* 1999) a histopatologie (Gookin *et al.* 2001; Yaeger & Gookin 2005).

Odběr vzorků

Diagnostika *T. foetus* vyžaduje správný způsob odběru, transportu a skladování vzorků trusu. Vzorky stolice lze získat třemi způsoby: sběr trusu, výtěr střev (rekta) a výplach střev. Sběr trusu z kočičích záchodků je důležitým krokem, při špatném odběru může dojít ke snížení detekce parazita. Pokud se odebírá trus ze záchodkových bedýnek, je zapotřebí izolovat kočku a zabránit tak kontaminaci jiným zvířetem, nepoužívat stelivo, popřípadě čisté nedrolící se, aby se trus nekontaminoval inhibitory. Stolica musí být odebrána čerstvá a vlhká, trus několik hodin starý a suchý je nepoužitelný (Gookin 2009). Důležité je odebírat část exkrementu, která je nejvíce mazlavá. Zde je největší pravděpodobnost živých prvoků. Trofozoiti jsou přítomni v nejvyšším počtu v mukóze kolonu, což je první část trusu, která se vysuší během transportu do laboratoře (Bell *et al.* 2010). Pro spolehlivější diagnostiku *T. foetus* je odběr stolice přímo ze střeva kočky, jež lze provádět několika metodami: 1) rektálním tamponem, 2) fekální kličkou, 3) výplachem střev. Fekální klička je vhodnější než rektální tampón (vatová tyčinka) z důvodů inhibice PCR reakce z materiálu vaty (Gookin 2009). Kličkou i tamponem je nutné provést výtěr dostatečně hluboko ve střevě, neboť

vytření pouze konečnickového otvoru je pro diagnostiku *T. foetus* nedostatečné (Gookin 2009). Před zavedením tamponu a kličky do rekta je potřeba zvlhčit materiál nejlépe fyziologickým roztokem. Neměly by se používat antiseptické speciální lubrikační masti, aby nedošlo k inhibici PCR reakce popřípadě k usmrcení trofozoitů. Výplach střev fyziologickým roztokem je hodnocen jako nejlepší metoda pro sběr stolice. Při výplachu střev je zaveden katetr *per rectum* do střeva a aplikováno přibližně 10 ml roztoku, který je následně nasán i s obsahem střev. Suspenze pak může být použita pro mikroskopii, kultivaci a k analýze PCR (Gookin *et al.* 2001). Odběr vzorků na histopatologii je prováděn endoskopií tlustého střeva, biopsií či nekropsií. Je důležité odebrat několik vzorků tkáně z různých sekcí střeva, neboť se trichomonády nevyskytují po celé délce střeva. Vzorky sliznice jsou fixovány 10% formalinem a zalévány do parafínu (Gookin *et al.* 2001; Stockdale *et al.* 2008; Yaeger & Gookin 2005).

Účinnost diagnostiky lze zvýšit nejen vhodně odebraným trusem či způsobem dodání do laboratoře, ale i opakovaným sbíráním a testováním stolice. U přirozeně nakažených koček trofozoité mohou ubývat v průběhu několika málo hodin či dnů a přítomnost prvoků tak klesá pod detekční limit. Několik studií potvrdilo fluktuaci parazitů v trusu v průběhu nákazy (Gookin *et al.* 2001; Stockdale *et al.* 2008; Hale *et al.* 2009). Například při vyšetřování pěti vzorků trusu nakažených koček po 12 hodinách, dva vzorky byly negativní na *T. foetus*. Z 12-ti vzorků trusu odebraných během čtyř týdnů od dvou nakažených koček také nebyly všechny vzorky pozitivní (Vermeulen 2009). Detekci trofozoitů snižuje i léčba antibiotiky (Foster *et al.* 2004).

Střevní roztěr

Živé trichomonády mohou být diagnostikovány přímo světelnou mikroskopií z čerstvého trusu, nebo stěru z rektálního výtěru či hleny. Při roztěru se používá fyziologický roztok a trichomonády jsou vyšetřovány při zvětšení 100 x až 400 x. Z důvodu snadné přípravy a nenáročnosti materiálů se tento typ diagnostického testu považuje za nejjednodušší a nejlevnější (Gookin *et al.* 2001). Trichomonády nepřežijí chlazení a nedají se pozorovat po vyšetření trusu flotační metodou a sedimentací. Pokud nelze vyšetřovat trus ihned, lze jej naředit fyziologickým roztokem (3 ml 0,9 % roztoku chloridu sodného na 2 g trusu), kde trofozoiti nevyschnou a vydrží i čtyři dny (Greene 2006).

Nevýhodou mikroskopie je její nízká senzitivita (Hale *et al.* 2009). Gookin *et al.* (2001, 2003) zjistili, že citlivost světelné mikroskopie je u experimentálně nakažených koček v chronické fázi infekce pouze 2 %. Foster *et al.* (2004) dále uvádí, že u koček přirozeně nemocných je citlivost výše zmíněné metody pouhých 14 %.

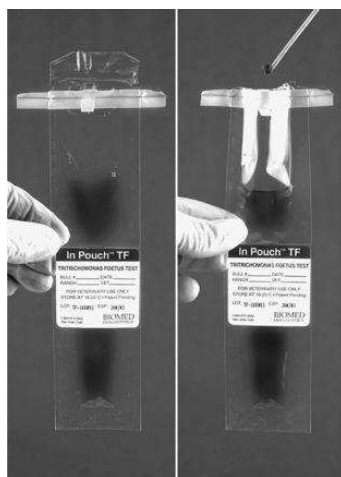
Při světelné mikroskopií je nutné vyšetřovat sérii několika roztěrů trusu a dbát na správné zásady odběru vzorků, neboť spolehlivost této metody závisí na vysokém počtu trofozoitů v nátěru. Při vyšetřování je zapotřebí znalost morfologie a typu pohybu trofozoitů žijících ve střevech, aby

nedošlo k záměně *T. foetus* za *P. hominis* či dokonce *Giardia* spp. (Gookin *et al.* 2003). Odlišení *P. hominis* od *T. foetus* je v běžné veterinární praxi náročné a lze pouze obtížně provádět u nativních preparátů. V tomto případě je výhodné diagnostikovat na základě trvalých preparátů barvenými speciálními technikami (Greene 2006).

Kultivace vzorků trusu

Tritrichomonas foetus lze diagnostikovat kultivací dvěma způsoby: 1) v Diamondovu mediu s antibiotiky inkubací při 37 °C; 2) v komerčně vyráběných specifických kultivačních systémech tzv. „InPouch™ TF“ (Biomed Diagnostics, White City, Oregon, USA). Dvě studie (Gookin *et al.* 2004; Hale *et al.* 2009) porovnávaly detekční limit medií komerčního InPouch™ TF kultivačního systému a Diamondova média se specifickou dávkou antibiotik. V první studii nebyl nalezen rozdíl v detekčních limitech obou zmíněných médií (Gookin *et al.* 2004), zato ve druhé byla zjištěna senzitivita InPouch™ TF systému 83 % a Diamondovu mediu 100 % (Hale *et al.* 2009). V současné době je kočičí kultivační InPouch™ TF systém považován za velmi citlivou diagnostiku trichomoniázy u koček. Nicméně špatné odebrání a naočkování vzorku trusu do kultivačního systému citlivost snižuje. Na 0,05 g trusu je detekční limit 1000 buněk (Gookin *et al.* 2003), při inokulaci více jak 0,1 g trusu je citlivost snížena na 56 % (Gookin *et al.* 2003; Gookin *et al.* 2004). Je doporučováno kultivaci trusu provést opakovaně nejlépe třikrát podobu sedmi až deseti dnů (Hale *et al.* 2009). Jelikož detekční limit diagnostiky kultivací závisí na živých trofozoitech, musí se stejně jako u mikroskopických technik dbát na správný odběr vzorků trusu, který by měl být nejen vlhký, čerstvý ale i nechlazený. Exkrementy skladované při pokojové teplotě jsou vhodným materiálem pro diagnostiku ještě po šesti hodinách (Hale *et al.* 2009). Nejlépe však je inokulovat vzorek do média do 15 minut (Rosypal *et al.* 2012). Následně je kultivační InPouch™ TF systém inkubován při pokojové teplotě (Gookin *et al.* 2003; Hale *et al.* 2009) nebo při 37 °C. V tomto případě však vzorek rychle přerůstá bakteriemi. Pokud medium inkubujeme při 25 °C, pozitivita je vidět mezi prvním a jedenáctým dnem od inokulace. Při inkubaci 37 °C jsou živí trofozoiti přítomni mezi prvním a šestým dnem. Přítomnost *T. foetus* je poté zjišťována světelnou mikroskopií přímo v sáčku kultivačního média InPouch™ TF. Kultivační InPouch™ TF systém by měl být specifický pro růst *T. foetus* a *Giardia* spp. či *P. hominis* by v mediu neměly přežít déle než 24 hodin (Gookin *et al.* 2003). Nicméně bylo publikováno, že *P. hominis* rostl v mediu ještě pátý den (Ceplecha *et al.* 2013).

Obrázek 8: Kultivační InPouch™ TF systém (převzato z Greene 2006).



PCR diagnostika

Nejcitlivější diagnostickou metodou pro identifikaci *T. foetus* u koček představuje metoda PCR (Felleisen *et al.* 1998; Gookin *et al.* 2002; Grahn *et al.* 2005). Výhodou PCR amplifikace oproti InPouch™ TF kultivačnímu systému je detekce DNA jak z živých, tak i z mrtvých buněk. Diagnostická metoda PCR je založena na amplifikaci sekvence genu pro 5.8S rRNA a ITS1 a ITS2 regionů, které jsou vysoce konzervovány mezi různými geograficky vzdálenými trichomonádami (Felleisen 1997). Detekční limit pro PCR je uváděn jako 10 organismů na 200 µl vzorku trusu (Felleisen *et al.* 1998; Gookin *et al.* 2002).

Pro spolehlivou diagnostiku *T. foetus* pomocí PCR musí být exkrementy vždy čerstvé, neobalené podestýlkou, nebo jiným materiálem a drženy v chladu. Pro PCR amplifikaci je důležité, aby v mrtvých buňkách nedošlo k degradaci DNA. Pro lepší specifitu a citlivost PCR reakce lze optimalizovat a modifikovat celý diagnostický postup od izolace DNA až po aditiva v PCR reakční směsi (Gookin *et al.* 2002). Vzorek trusu se skládá z mnoha složek, které se mohou extrahovat společně s DNA patogena a inhibují následně amplifikaci PCR reakce. K takovým komponentům patří komplexi polysacharidů, žlučových solí, degradačních zbytků hemoglobinu, stopy fenolu a těžkých kovů. Mezi fekální inhibitory patří biologické látky jako je příměs krve (Gookin *et al.* 2002; Stauffer *et al.* 2008).

InPouchTM TF versus PCR

Při diagnostice *T. foetus* jsou častěji používány InPouch™ TF kultivační systémy než PCR testy, přestože by měly být více citlivé. Některé studie ukazují vysokou míru shody detekce mezi oběma testy (Hosein *et al.* 2013). Lze použít oba testy zároveň, tedy PCR analýzu lze udělat z kultivačního média. Při srovnání metod bylo detekováno oběma metodami zároveň 22 z 24 pozitivních koček, přičemž zvlášť PCR metodou z trusu bylo detekováno 12 pozitivních koček

a zvláště kultivací bylo zjištěno 11 pozitivních koček. Detekční limit PCR analýzy z kultivačního media byl 10 organismů v 200 µl (Vermeulen 2009).

Histopatologie

Endoskopické řezy sliznice tlustého střeva, které jsou fixované ve formalínu, obarvené hematoxylinem a eozinem lze použít na detekci trofozoitů *T. foetus*. Vyšetřování vyžaduje prozkoumání více sekcí střeva (Yaeger & Gookin 2005).

Na histologických řezech v parafínu lze realizovat i fluorescenčně druhově specifickou *in situ* hybridizaci (Gookin *et al.* 2010b). Nevýhodou této metody je autofluorescence krve ve vzorcích. Nedávno byla vyrobena oligonukleotidová sonda „Tritri probe“ pro detekci *T. foetus* pomocí chromogenní *in situ* hybridizace (CISH), která uvedenou nevýhodu nemá (Mostegl *et al.* 2012). Navíc, jak se ukázalo, CISH metodu lze využít nejen při vyšetřování vzorků z pitevního materiálu, ale také pro analýzu vzorků biopsie. Citlivost techniky je považována za velmi dobrou, specifčnost sond lze snadno ověřit amplifikací a sekvencí (Mostegl *et al.* 2012).

Léčba

Trichomoniáza koček je léčena 5-nitroimidazolovým preparátem, ronidazolem (Gookin *et al.* 2006). Některé kmeny *T. foetus* mohou být rezistentní (Gookin *et al.* 2010a). Skutečná efektivní a šetrná léčba se stále vyvíjí. Bez léčení může průjem spontánně vymizet, ale kočka se stane asymptomatickým nosičem (Payne & Artzer 2009).

Lék se podává perorálně, nejlépe s potravou. Léčebná dávka se pohybuje v rozmezí 30-50 mg/kg denně nebo dvakrát denně po dobu 14-ti dnů (Gookin *et al.* 2006). Nicméně bylo prokázáno, že po perorálním podání je ronidazol detekovatelný v plazmě déle než 48 hodin a konečná koncentrace léku se dostane až do cílového místa, tj. do tkáně sliznice tlustého střeva (Bell *et al.* 2010). Z této studie vyplývá, že podávání léku jednou denně by mělo být pro léčbu dostačující.

Ve většině případů se průjmy po léčbě nevrací ani po následných šesti měsících (Bell *et al.* 2010). V chovu, ve kterém je nákaza diagnostikována, by se měly léčit všechny kočky i přesto, že ostatní zvířata nevykazují žádné klinické příznaky. Výskyt subklinicky infikovaných koček vytváří opakované problémy s nemocí v chovech (Bell *et al.* 2010)

Po prvních dnech podávání léku se sníží akutnost průjmu a během dvou týdnů se průjmy mění na normální konzistenci stolice (Gookin *et al.* 2006; Bell *et al.* 2010; Holliday *et al.* 2009). U těžkých případů průjmů a zánětů střev se léčba komplikuje. Jsou popsány případy, kdy léčba úspěšná není a po ukončení terapie onemocnění znovu propukne (Gookin *et al.* 2010a). Pro úplnou eliminaci prvoka lze léčbu opakovat v několika cyklech (Gookin *et al.* 2006).

Nežádoucím účinkem ronidazolu je neurotoxicita. Neurotoxické efekty závisí na tom, jak dlouho jsou kočky léčeny, neboť je lék akumulován v organismu (LeVine *et al.* 2011). Z tohoto důvodu jsou léky podávány v určitém bezpečnostním limitu.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Složení a příprava kultivačních médií

4.1.1. Dvofázové médium dle Dobella a Leidlawa (1926), modifikováno

Příprava:

- 1) Pevná složka: Do 15 ml plastových šroubovacích zkumavek rozplnit 2 ml sterilního inaktivovaného koňského séra. Zkumavky šikmo položit do horkovzdušného sterilizátoru při 80 °C po dobu jedné hodiny, kde se sérum koaguluje a vznikne pevná složka. Zkumavky nechat při pokojové teplotě 24 hodin a poté cyklus sterilizace zopakovat. Hotovou pevnou složku uchovávat v lednici.
- 2) Tekutá složka: Ringerův roztok připravit smícháním sterilních roztoků A a B (tabulka 1). Tyto roztoky se připravují a autoklávuji odděleně proto, aby nedošlo k vysrážení fosfátů, které jsou obsaženy ve složce A, chloridem vápenatým, který obsahuje složka B. Do 250 ml Ringerova roztoku sterilně přidat 25 ml vaječného bílku. Tekutou složku uchovávat při 4 °C. Týden před použitím rozplnit do zkumavek tekutou složku tak, aby překryla koagulované sérum.

Tabulka 1: Složení Ringerova roztoku.

Roztok A

NaCl	6,5 g
NaHCO ₃	0,2 g
KCl	0,14 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	0,011 g
destilovaná voda	doplnit do 900 ml

Roztok B

CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,14 g
destilovaná voda	doplnit do 100 ml

4.1.2. Médium dle Wenricha

Médium dle Wenricha obsahuje Loefflerovo krevní sérum (Difco, 270100) a Ringerův roztok (příprava viz tekutá složka media dle Dobella a Leidlawy).

Příprava:

- 1) Loefflerovo krevní sérum (2 g) rozpustit v 1000 ml Ringerova roztoku (pH 7,4) ve vodní lázni o teplotě 45 °C po dobu 30 minut s občasným mícháním.
- 2) Vařit ve vodní lázni 20 minut.
- 3) Přes noc ponechat směs v lednici.
- 4) Druhý den filtrovat přes filtrační papír a autoklávovat.
- 5) Po vychladnutí médium sterilně rozplnit do zkumavek po 10 ml a skladovat v lednici.

4.1.3. Médium TYSGM-9 (Diamond 1982), modifikováno

Příprava:

- 1) Rozpustit složky média (tabulka 2) v destilované vodě.
- 2) Upravit pH média 1M roztokem KOH na 7,2 pH.
- 3) Upravit objem a autoklávovat.
- 4) Po vychladnutí sterilně přidat hovězí sérum (tabulka 2).
- 5) Médium rozplnit do šroubovacích zkumavek po 10 ml.
- 6) Médium uchovávat v lednici.

Tabulka 2: Složení média dle TYSGM.

Trypton (enzymatický hydrolyzát)	1 g
Kvasničný extrakt (autolyzát)	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1,4 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaCl	3,75 g
Destilovaná voda	do 485 ml
Inaktivované hovězí sérum	15 ml

4.1.4. Diamondovo médium TYM (1957)

Příprava:

- 1) Rozpustit složky média (tabulka 3) v destilované vodě.
- 2) Upravit pH média 1M roztokem KOH na 7,2 pH.
- 3) Upravit objem a autoklávovat. Horké médium promíchat.
- 4) Po vychladnutí sterilně přidat koňské inaktivované sérum (tabulka 3).
- 5) Médium rozplnit do zkumavek po 10 ml pro kultivaci axenických kultur. Pro kultivaci z výtěru střev byla do média přidána antibiotika (tabulka 4) a médium bylo rozplněno po 7 ml do malých šroubovacích zkumavek.
- 6) Médium uchovávat v lednici.

Tabulka 3: Složky Diamondova média.

K ₂ HPO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Kyselina askorbová	0,05 g
L-cystein HCl	0,25 g
Maltosa	1,25 g
Kvasničný extrakt (autolyzát)	5 g
Trypton (enzymatický hydrolyzát)	0,2 g
Citrát železitoamonný	250 µl
Agar	0,125
Destilovaná voda	do 225 ml
Inaktivované koňské sérum	25 ml

Tabulka 4: Použitá Antibiotika

Zásobní roztok	Na 10 ml média
Penicilin (1000 I.U./ml)	200 µl
Amikacin (250 µg / ml)	100 µl
Ciprofloxacin (1mg/ml)	100 µl

4.1.5. Média pro transformaci *E. coli*

LB médium

Příprava:

- 1) Rozpustit složky média v destilované vodě (tabulka 5) a autoklávovat.
- 2) Pro přípravu ploten zatepla rozlít médium do petriho misek.

Tabulka 5: LB médium.

a) Pro tekuté médium

LB Broth médium (SIGMA)	10 g
Destilovaná voda	do 500 ml

b) Pro přípravu ploten

LB Agar médium (SIGMA)	17 g
Destilovaná voda	do 500 ml

SOC médium

Příprava:

- 1) Rozpustit trypton, autolyzát, NaCl a KCl v destilované vodě (tabulka 6).
- 2) Doplnit objem do 100 ml a upravit pH.
- 3) Autoklávovat.
- 4) Po vychladnutí přidat glukózu a MgCl₂ (tabulka 6).
- 5) Médium rozplnit po 1 ml do mikrozkupek a uchovávat v -20 °C.

Tabulka 6: Složky SOC media.

Trypton	2 g
Kvasničný autolyzát	0,5 g
NaCl	0,058 g
KCl (250 mM)	1 ml
MgCl ₂ (2 M, sterilní)	0,5 ml
Glukóza (20 %, sterilní)	1,8 ml

4.2. Použité metody a techniky

4.2.1. Příprava a zpracování trvalých preparátů

Barvení protargolem dle Bodiany 1917

1. Příprava a fixace vlhkých nátěrů

Bouin - Hollandova fixáž

Příprava:

- 1) Za studena rozpustit octan měďnatý.
- 2) Zvolna přidávat kyselinu pikrovou.
- 3) Po rozpuštění roztok zfiltrovat a přidat formaldehyd.
- 4) Těsně před použitím fixáže přidat kyselinu octovou.

Kyselina pikrová	4 g
Octan měďnatý neutrální	2,5 g
Formaldehyd 40%	10 ml
Kyselina octová	1.5 ml
Destilovaná voda	100 ml

Postup fixace:

- 1) Buněčnou kulturu stočit v mikrozkuhavce 3 minuty při 13 500 rpm.
- 2) Pelet buněk nasát do zúžené pasturovy pipety a lehce rozetřít koncem pipety po krycím skle. Pro roztěry použít podložní skla č. 0, dobře odmaštěná v etanol-etheru (1:1).
- 3) Okamžitě (dříve než buněčná kultura zaschne) položit sklíčko nátěrem dolů na hladinu fixačního roztoku v petriho misce a ponechat několik minut.
- 4) Sklíčko obrátit pomocí preparačních jehel nátěrem vzhůru a ponořit na dno misky s fixáží. Nátěr fixovat 12 hodin.
- 5) Opláchnout 50% alkoholem a vypírat v 70% alkoholu.
- 6) Ke každému sklíčku upevnit štítek z polyetylenu, který je předem popsán a je na něm označena orientace nátěru.
- 7) Preparáty uložit do kádinky se 70% alkoholem.

2. Barvení

Příprava:

- 1) 0,5% vodný roztok KMnO_4 (LACHEMA)
- 2) 5% vodný roztok kyseliny šťavelové $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ (LACHEMA)
- 3) 2% kyseliny šťavelové $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$
- 4) 1% vodný roztok protargolu (Bayer, I. G. Farbenindustrie Aktiengesellschaft)

Roztok protargolu připravit vždy čerstvý, bezprostředně před použitím. Navážený protargol nasypat na hladinu destilované vody v kádince, nechat samovolně rozpustit, nemíchat, neprotřepávat, nezahřívát.

- 5) Redukční roztok:

Hydrochinon	1 g
Siřičitan sodný (CHEMAPOL).....	2,5 g
Destilované vody	100 ml

Roztok připravit vždy čerstvý bezprostředně před použitím.

- 6) 0,25% vodný roztok žlutého chloridu zlatitého AuCl_3 .

Připravit 1% zásobní roztok v destilované vodě a uchovávat v naprosto čisté tmavé lahvi. Těsně před použitím ředit v poměru 1:3 destilovanou vodou a okyselit ledovou kyselinou octovou (1 kapka na 50 ml roztoku).

- 7) 5% vodný roztok sirnatanu sodného (LACHEMA)
- 8) měděné drátky
- 9) 50% etylalkohol na vypírání fixáže
- 10) odvodňovací a zalévací řada (alkoholy 50%, 70%, 80%, 96%, 100%, xylol 2x)
- 11) kanadský balzám (DPX Mounting for histology, FLUKA)

Postup barvení:

- 1) Preparáty převést ze 70% etanolu přes 50% etanol do destilované vody.
- 2) Vložit do 0,5% roztoku manganistanu draselného - 5 minut.
- 3) Opláchnout v destilované vodě - 5x po 30 s.
- 4) Vložit do 5% roztoku kyseliny šťavelové - 5 minut.
- 5) Opláchnout v destilované vodě - 5x po 30 s.

- 6) Ještě mokré preparáty (nesmí vyschnout) vložit ve svislé poloze do kádinky se stočeným a očištěným měděným drátem, zalitým 1% roztokem protargolu. (Na 100 ml roztoku se přidává 5 g měděného drátu.) Do kádinky s narovnanými preparáty vložit tenké měděné drátky.
- 7) Kádinku dobře uzavřít a vložit do termostatu při 37 °C - 48 hodin
- 8) Preparáty opláchnout v destilované vodě - 2x po 5 s.
- 9) Preparáty vložit do redukčního roztoku (vodný roztok 1 % hydrochinonu a 5 % siřičitanu sodného) - 10 minut.
- 10) Opláchnout v destilované vodě - 5x po 30 s.
- 11) Preparáty vložit do 0,5% roztoku chloridu zlatitého (při tomto kroku je nutné používat plastovou pinzetu, aby nedošlo k vysrážení koloidního zlata) - 5 minut.
- 12) Opláchnout v destilované vodě - 2x po 5 s.
- 13) Preparáty vložit do 2% roztoku kyseliny šťavelové - 5 minut.
- 14) Opláchnout v destilované vodě - 5x po 30 s.
- 15) Preparáty vložit do 5% roztoku thiosíranu sodného - 10 minut.
- 16) Preparáty propírat pod pomalu tekoucí vodou - 15 až 20 minut.
- 17) Preparáty převést alkoholovou řadou (50%, 70%, 80%, 96%, 100% etanol) do xylenu.
- 18) V konečné fázi sklíčka montovat na podložní skla do kapky kanadského balzámu. Sklíčka nechat utuhnout ve vodorovné poloze - 48 hodin.

Nabarvené preparáty byly následně pozorovány mikroskopem Olympus BX51 a fotografovány digitální kamerou Olympus DP71.

4.2.2. Příprava vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii

Fixáž

2,5% glutaraldehyd/ 5 mM CaCl₂/ 0,1M kakodylátový pufr pH 7,2-7,4

Příprava:

- 1) K zásobnímu roztoku 0,2 M kakodylátu sodného (Polysciences, Inc.) (500 µl) přidat 0,1 N kyselinu chlorovodíkovou (50 µl) a promíchat.
- 2) Přidat 0,1 M chlorid vápenatý (50 µl) a dobře promíchat.
- 3) Přidat 70% glutaraldehyd (Polysciences, Inc.) (36 µl).
- 4) Přidat deionizovanou vodu (364 µl) a fixáž velmi dobře promíchat.
- 5) Upravit pH na 7,4 přidáním 0,1 N hydroxidu draselného.

Post-fixáž

1% OsO₄/ 0,8% ferrikyanid draselný/ 5mM CaCl₂/ 0,1 M kakodylátový pufr pH 7,2-7,4

Příprava roztok I. : 1,6% ferrikyanid draselný/ 10 mM CaCl₂/ 0,2 M kakodylátový pufr pH 7,2-7,4

- 1) Ferrikyanid draselný (1,6 g) rozpustit ve 100 ml kakodylátového pufru
- 2) Přidat CaCl₂ · 6H₂O (0,22 g)
- 3) Výsledný roztok uchovávat v tmavé lahvi v lednici do vypořebování.

Příprava roztok II. :

- 1) Naředit 4% oxid osmičelý (Polysciences, Inc.) (125 µl) na 2% 0,2 M kakodylátovým puforem (125 µl).
- 2) Roztok vychladit v lednici.

Příprava vzorku

1. Fixace:

- 1) Dobře narostlé kultury stočit 10 minut na 1000 x g.
- 2) Na pelet napipetovat fixáž (2,5% glutaraldehyd/ 5 mM CaCl₂/ 0,1m kakodylátový pufr).
- 3) Pelet fixovat 2 hodiny při pokojové teplotě.

- 4) Vzorek 3x vyprat v PBS pH 7,2 (vychlazený) – vždy napipetovat 1,5 ml, resuspendovat a centrifugovat (5000 rpm/5 min).

2. *Post-fixace:*

- 1) Na promytý pelet nakapat vychlazený roztok I. (250µl).
- 2) Ihned přidat roztok II. (250µl).
- 3) Směs řádně promíchat Pasteurovou pipetou.
- 4) Vzorek fixovat v lednici 15 minut.

3. *Praní:*

- 1) Po post-fixaci dolít zkumavku 10 ml PBS pH 7,2 a centrifugovat (5000 x g / 10 minut / 4 °C).
- 2) Vzorky 3x vypírat vždy 10 ml PBS.

4. *Dehydratace:*

- 1) Po poslední centrifugaci odsát PBS a k peletu přidat 70% aceton.
- 2) Pelet resuspendovat a přenést do mikrozukavky na 15 minut.
- 3) Vzorek centrifugovat 13000 x g/3 min tak, aby se vytvořil tvrdý pelet.
- 4) Pelet uvolnit opatrně špičatou špejlí ode dna mikrozukavky.
- 5) Aceton vylít a do mikrozukavky opět nalít 70% aceton (10 – 15 minut).
- 6) Aceton vylít a nalít 90% aceton (10 – 15 minut).
- 7) Aceton vylít a nalít 100% aceton (10 – 15 minut).
- 8) 100% aceton ještě 2 x vyměnit (vždy ponechán 10 – 15 minut).

5. *Zalévání:*

- 1) Naředit kompletní Epon 100% aceton v poměru 1:1 a 1:2 do mikrozukavek.
- 2) Epon: Poly/ BED 812 BDMA Mini (Polysciences, Inc.) – po řádném smíchání komponent podle návodu byl eponuchován v utěsněných injekčních stříkačkách při -20 °C.
- 3) Ke vzorku přidat směs 1:1 na 30 minut.
- 4) Ke vzorku přidat směs 1:2 přes noc.
- 5) Směs 1:2 vylít a na pelet nalít kompletní Epon.

- 6) Eponem promýt 3 x.
- 7) Epon nalít do BEEM kapsle (cca do $\frac{3}{4}$) a pelet přelít opatrně z mikrozkušavky na hladinu Eponu a Epon doplnit po okraj kapsle.
- 8) 24 hodin ponechat vzorek, aby pelet samovolně klesl na dno.
- 9) Vzorek nechat polymerizovat 24 hodin při 60 °C.

K dalšímu zpracování byly vzorky předány do laboratoře elektronové mikroskopie, kde probíhalo krájení ultratenkých řezů a kde byla provedena metoda negativního kontrastování totálních preparátů: na sítku pokrytou formvarovou nebo aktivovanou uhlíkovou blánou nakápnout suspenzi vzorku, adheze 2 minuty, odsátí kouskem filtračního papíru, fixace 2,5% GA v 0,1 M pufru 2-5 minut, opláchnutí několika kapkami destilované vody, kontrastování kapkou 2-3% vodného roztoku octanu uranylu nebo kyseliny fosfowolframové 2-3 minuty - alternativně kontrastovat v komůrce parami jodu (krystalický jód) 5-10 s (viz laboratoř elektronové mikroskopie: <http://web.natur.cuni.cz/~lem/>). Následně byly řezy prohlíženy pomocí transmisního elektronového mikroskopu TEM JEOL 1011 s CCD kamerou Veleta.

4.2.3. Stabilizace kultur v kapalném dusíku

Polyxenické i axenizované kultury trichomonád byly zamraženy v tekutém dusíku po 1 ml s 5% Dimethyl sulfoxidem (DMSO) v mikrozkušavkách (Cryogenic tubes NALGENE). Při vymrazování kultur byla mikrozkušavka z tekutého dusíku opatrně ponořena do vlažné vody po závit. Po rozmrazení byla celá kultura nejprve naočkována do media, kvůli naředění DMSO a hned znovu přeočkována do nové zkušavky.

4.2.4. Izolace DNA

DNA z axenických a polyxenických kultur byla izolována pomocí kitu „High Pure Template Preparation Kit“ (ROCHE) dle protokolu výrobce. V posledním kroku byla DNA eluována do 100 µl elučního pufru. Izolovaná DNA byla skladována v mrazáku při -20 °C.

DNA z výtěrů dutiny ústní psů a koček byla izolována pomocí stejného kitu (ROCHE) dle protokolu výrobce s následovnými modifikacemi: 1) ve 4. kroku promývání byl vzorek centrifugován 2,5 minuty, 2) v 5. kroku byla DNA inkubována s 50 µl elučního pufru 1 minutu. Izolovaná DNA byla skladována v mrazáku při -20 °C.

DNA z trusu psů a koček byla izolována pomocí kitu „QIAamp® DNA Stool Mini Kit“ (QIAGEN) podle protokolu výrobce. Pro zvýšení senzitivity byl protokol modifikován (Gookin *et al.* 2002): 1) v 9. a 10. kroku bylo k supernatantu přidáno 20 µl proteinázy K místo původních 15 µl

a vzorek byl navíc inkubován 1 hodinu při 56 °C, 2) krok 15. a 16. byl proveden dvakrát. V posledním kroku byla DNA eluována do 50 µl pufru AE a následně skladována v mrazáku -20 °C.

Z důvodů rizika kontaminace vzorků DNA *T. vaginalis* v naší laboratoři, byla izolace DNA z výtěrů a trusů a příprava PCR reakcí prováděna v laboratoři RNDr. Evy Nohýnkové, Ph.D., oddělení tropické medicíny 1. LF UK.

4.2.5. Nested PCR

Pomocí nested PCR byla amplifikována DNA v oblasti ITS1-5.8S rRNA-ITS2. K amplifikaci byly použity dvě sady primerů (tabulka 7). Zásobní roztoky primerů byly vždy desetkrát naředěny na výslednou koncentraci 10 pM.

Tabulka 7: Obecné primery na amplifikaci ITS1-5.8S rRNA-ITS2 trichomonád (Gookin *et al.* 2002; Kutišová *et al.* 2005).

	Primer	Sekvence	Velikost produktu
1. pár primerů	ITS-R	5'-TTCAGTTCAGCGGGTCTTCC-3'	350 bp
	ITS-F	5'-GTAGGTGAACCTGCCGTT-3'	
2. pár primerů	TFITS-F	5'-CTGCCGTTGGATCAGTTTCG-3'	208 bp
	TFITS-R	5'-GCAATGTGCATTCAAAGATCG-3'	

Reakční směs byla míchána podle tabulky 8 a tabulky 9. Do každého pokusu byla zařazena negativní kontrola, tj. vzorek bez DNA, místo DNA byla přidána voda, a pozitivní kontrola, tj. vzorek, do kterého byla přidána DNA z trichomonád. Byly připraveny vždy dvě PCR reakce. Do 1. PCR reakce byly zařazeny dvě kontroly: 1) negativní - 1µl vody, 2) pozitivní - 1µl DNA z trichomonád. Do 2. PCR reakce byly zařazeny tři kontroly: 1) negativní - 1µl vody, 2) negativní - 1µl PCR produktu z negativní kontroly z první reakce, 3) pozitivní - 1µl PCR produktu z pozitivní kontroly z první reakce. PCR byla provedena v termocykléru Veriti 96 Well Thermal Cycler za podmínek shrnutých v tabulce 10.

Tabulka 8: Složení reakční směsi pro 1. PCR reakci.

a) Amplifikace izolované DNA z výtěrů dutiny ústní.

Složky reakční směsi pro V = 25 µl	µl
Sterilní PCR H ₂ O	0,5
EmeraldAmp MAX PCR Master Mix	12,5
ITS-F	1
ITS-R	1
DNA	10

b) Amplifikace izolované DNA z trusu.

Složky reakční směsi pro V = 25 µl	µl
Sterilní PCR H ₂ O	0,5
EmeraldAmp MAX PCR Master Mix	12,5
BSA	2,5
ITS-F	1
ITS-R	1
DNA	1

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro 2. PCR reakci.

Složky reakční směsi pro V = 25 µl	µl
Sterilní H ₂ O	0,5
EmeraldAmp MAX PCR Master Mix (TAKARA)	12,5
TFITS-F	1
TFITS-R	1
Amplifikovaná DNA z 1. Reakce	1

Tabulka 10: Teplotní podmínky PCR reakce.

Proces	Teplota [°C]	Čas[min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	5,00	1
Denaturace	95	0,30	35
Nasedání primerů	60 (primery ITS)	0,30	
	57 (primery TFITS)		
Polymerace	72	0,30	
Závěrečná polymerace	94	5,00	1
	15	neomezeně	

Pro vyloučení selhání izolace DNA byla u negativních vzorků amplifikována DNA psa a kočky pomocí primeru BG-F a BG-R (tabulka 11) za teplotních podmínek reakce v tabulce 12.

Tabulka 11: Primery na amplifikaci betaglobinu HBB kočky a psa

Primer	Sekvence	Velikost produktu
BG-F	5'-ATGAAGTGCGGCGAGGCC-3'	978 bp
BG-R	5'-CACACACACCAGCACGTTGC-3'	

Tabulka 12: Složení reakční směsi pro PCR.

Složky reakční směsi pro V = 25 µl	µl
Sterilní miliQ H ₂ O	0,5
EmeraldAmp MAX PCR Master Mix	12,5
BG-F	1
BG-R	1
DNA	1

4.2.6. Gelová elektroforéza a purifikace PCR produktu

DNA izolovaná z výtěru dutiny ústní a trusu amplifikována pomocí PCR byla analyzována na 2 až 3 % agarózovém gelu. Do jamek byl napipetován celý objem PCR produktu (25 µl). Fragment DNA byl po elektroforéze vizualizovaný pomocí „SYBR green“. V závislosti na typu vzorku byly pozitivní vzorky vyříznuty z gelu a přečištěny pomocí kitu „OIAguick®Gel Extraction Kit“. Purifikovaná DNA byla eluována do 30 µl elučního pufru. Následně byl vzorek DNA poslán na sekvenaci z obou směrů. Popřípadě byla DNA zaklonována do plastidu TOPO a sekvenována následně.

DNA izolována z kultur byla amplifikována pomocí PCR a analyzována na 1,5 % agarózovém gelu. Do jamek bylo napipetováno 5 µl PCR produktu. Jestliže byl na gelu patrný pouze jeden fragment, byl PCR produkt purifikován přímo z reakční směsi pomocí komerčně vyráběného kitu „High Pure PCR Product purification Kit“ (ROCHE). V případě, že na gelu bylo patrné více fragmentů, byla provedena elektroforéza s větším množstvím PCR produktu, požadované fragmenty byly z gelu vyříznuty a přečištěny pomocí kitu „OIAguick®Gel Extraction Kit“. V obou případech byla purifikovaná DNA eluována do 30 µl elučního pufru. DNA byla zaklonována do plastidu TOPO a osekvenována. Zbylá DNA byla uchována v -20 °C.

4.2.7. Klonování

Ligace do vektoru TOPO

PCR produkt byl vložen do vektoru TOPO pomocí kitu „TOPO TA Cloning® Kit“ (Invitrogen) podle protokolu výrobce. Ligační směs obsahovala PCR produkt (2 µl), roztok solí (0,5 µl) a vektor (0,5 µl). Vektor bylo nutné držet na ledu, směs byla po přidání vektoru krátce stočena a inkubována při 25 °C 45 minut.

Transformace buněk:

- 1) K 100 µl kompetentních buněk TOP10 *Escherichia coli* bylo přidáno 3 µl ligační směsi.
- 2) Směs byla inkubována na ledu 20 minut.
- 3) *E. coli* byla vystavena teplotnímu šoku přesně na 35 s ponořením do lázně o 42 °C.
- 4) Ihned poté byla směs vrácena na led a inkubována 2 minuty.
- 5) Ke směsi bylo přidáno 250 µl SOC media (tabulka 6).
- 6) Směs byla inkubována na stolní třepačce při 180 rpm 1 hodinu při 37 °C.
- 7) Po inkubaci byly bakterie vysety na plotnu, ztuhlá směs agaru a LB media (tabulka 5b) s 30 µl Kanamycinu a 30 µl X- gal (50 mg/ml).
- 8) Směs byla kultivována dnem vzhůru v termostatu 12-16 hodin.

Kontrola přítomnosti inzertu v plasmidu pomocí PCR

Pomocí sterilní špičky byly z každé plotny odebrány 3 bílé kolonie a resuspendovány v 20 µl PCR vody ve sterilních mikrozkuřavkách. Z mikrozkuřavek bylo odebráno 5 µl suspenze a přidáno, na místo DNA, k PCR reakční směsi připravené podle tabulky 9. Poté byla amplifikována vložená DNA pomocí PCR (tabulka 10). DNA fragmenty v plasmidu byly po elektroforéze vizualizovány pomocí „SYBR green“. Přítomný fragment požadované délky znamenal pozitivní kolonii.

Izolace plasmidové DNA z bakterií

Jedna vybraná pozitivní kolonie z každé plotny byla resuspendovaná v mikrozkuřavce a byla naočkovaná do 5 ml tekutého LB média (tabulka 5a) s 5 µl kanamycinu a inkubována na třepačce při 37 °C 12-16 hodin.

Narostlé buňky byly centrifugovány při 4000 x g po dobu 5 minut a supernatant byl poté odlit. Plasmidová DNA byla izolována pomocí kitu „High Pure Plasmid Isolation Kit“. Plasmidová DNA byla eluována do 40 µl elučního pufru a koncentrace vyizolované DNA byla měřena

na spektrofotometru (NanoDrop® ND-1000, ThermoFisher Scientific). Vzorek byl skladován v -20 °C.

4.3. Diagnostické metody

Kultivací a molekulárními metodami byly zjišťovány dvě skupiny trichomonád 1) trichomonády žijící v dutině ústní psů a koček, tzv. orální trichomonády a 2) trichomonády žijící v zažívacím traktu psů a koček, tzv. střevní trichomonády.

4.3.1. Orální trichomonády

Způsob odběru

Vzorky byly získány výtěrem sliznice dutiny ústní sterilní vatovou tyčinkou (DELTALAB). Výtěr byl vložen a uzavřen do 2 zkumavek: 1) do kultivačního média dle Dobell-Leidlawa, 2) do 4 ml 96 % etanolu, která byla promíchána. Vzorky v médiu byly transportovány do 24 hodin do laboratoře v polystyrenovém boxu o teplotě 20-30 °C, a poté byly vloženy do termostatu (37 °C). Vzorky v etanolu byly transportovány v polystyrenovém boxu s ledem a uloženy do lednice.

Zpracování vzorků v kultivačním médiu

Odebrané vzorky byly kultivovány v termostatu při 37 °C. Od druhého dne po dobu deseti dnů byly vzorky kontrolovány světelnou mikroskopií při zvětšení 100 x. Pozitivní kultury byly přeočkovány tak, že ze dna zkumavky byl odebrán cca 1ml a přenesen do čistého media podle Wenricha nebo do média TYSGM, kde nepřerůstali kultury bakteriemi a byly pasážovány minimálně dalších deset dnů. Dobře rostoucí kultury byly zamrazeny do tekutého dusíku po třech zkumavkách.

Z kultur byla izolována DNA, z které byla amplifikována oblast ITS1-5.8S rRNA-ITS2 pomocí 1. párem obecných primerů (ITS tabulka 7). Tato oblast byla dále zaklonována a sekvenována. Výsledná sekvence DNA oblasti ITS1-5.8S rRNA-ITS2 byla použita pro fylogenetické analýzy.

Zpracování vzorků v etanolu

Vzorky v etanolu byly sterilně rozděleny plastovými pipetami do 2 ml mikrozkušavek. Jedna zkumavka byla vždy zamrazena v -80 °C a druhá použita pro izolaci DNA. Před izolací byly vzorky centrifugovány při 13 000 x g 15 minut. Následně byl odstraněn supernatant a pelet byl resuspendován v 200 µl vychlazeného PBS. Z takto připraveného vzorku byla izolována DNA. Vzorek eluované DNA byl podroben testu nested PCR. Pokud byl vzorek pozitivní a DNA nebyla získána kultivací paralelního vzorku, byla amplifikovaná DNA ze vzorku z etanolu dále klonována do plastidu a sekvenována pro získání sekvence v oblasti ITS1-5.8S rRNA-ITS2.

4.3.2. Střevní trichomonády

Způsob odběru

Vzorky na diagnostiku střevních trichomonád byly odebírány především u koček s průjmami, koťat do 1 roku, čistokrevných koček a koček žijících pohromadě s více jak pěti dalšími kočkami. Dále byly odebírány pouze u psů do 1 roku s průjmami a v útlucích u psů s průjmami, ale pouze v případě, kdy průjem nebyl způsoben změnou krmiva.

Pro kultivaci byly vzorky získány výtěrem konečníku vatovou tyčinkou do média (Diamondovo médium s antibiotiky), transportovány do 24 hodin do laboratoře v polystyrenovém boxu o teplotě 20-30 °C a následně vloženy do termostatu (37 °C). Pro molekulární diagnostiku byl do etanolu (10 ml 96 % etanol) odebrán cca 1 g čerstvého trusu bez podestýlky a jiné kontaminace nebo byl proveden výplach střev veterinárním lékařem – zavedení katetru per rektum do lumenu střev a pomocí injekční stříkačky vypláchnutí obsahu střev cca 5 ml fyziologického roztoku. Vzorek byl v etanolu promíchán a vložen do lednice.

Zpracování vzorků v kultivačním médiu

Vzorky kultivované ze střev byly kontrolovány ze středu a ze dna zkumavky, pozitivní kultury byly přeočkovány (0,5 ml) do Diamondova média TYM. Vzorek byl považován za negativní, jestliže nebyla žádná trichomonáda nalezena v primokultuře 10. den kultivace. Vykultivované trichomonády ze střev byly axenizovány pomocí migrační rourky s Diamondovým médiem a antibiotiky podle tabulky 4. Axenizované kultury byly zamrazeny do tekutého dusíku. Z každé axenizované kultury byla zároveň izolována DNA, která byla amplifikována 1. párem obecných primerů (tabulka 7) a amplifikovaná DNA byla klonována a poslána na sekvenaci.

Zpracování vzorků v etanolu

Vzorky trusu v etanolu byly homogenizovány a ze zkumavky byl sterilně odebrán homogenní trus do 2 ml mikrozkušavky pro izolaci DNA. Zkušavka se zbylým trusem byla zamrazena v -80 °C. Vzorek v mikrozkušavce byl centrifugován při 13 000 x g 15 minut. Po odstranění supernatantu byla ze vzorku izolována DNA. Vzorek eluované DNA byl podroben nested PCR. Pozitivní vzorky byly identifikovány 1) pomocí sekvenace, 2) pomocí nested PCR se specifickými primery pro amplifikaci DNA *Tritrichomonas foetus* v úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (tabulka 13) a 3) pomocí tandemové (dvojité) PCR za použití specifických primerů pro amplifikaci DNA *Pentatrichomonas hominis* v úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (tabulka 14). Reakční směs obou PCR reakcí byla míchána podle tabulky 9. Teplotní podmínky PCR reakcí jsou shrnuty v tabulce 15.

Tabulka 13: Specifické primery pro amplifikaci regionu ITS1-5.8S rRNA -ITS2 *Tritrichomonas foetus*.

	Primer	Sekvence	Velikost produktu
1. pár primerů	TF-F1	5'-CGTTAATAATTACAAACATATTT-3'	314 bp
	TF-R1	5'-GAGACAGAACCCTTTTGTTAATACA-3'	
2. pár primerů	TF-F2	5'-CACATAATCTAAAAAATTTAGACCT-3'	197 bp
	TF-R2	5'-TTGGTATTAAATTAATATGGGT-3'	

Tabulka 14: Specifické primery pro amplifikaci DNA *P. hominis* (v regionu ITS1-5.8S rRNA-ITS2).

Primer	Sekvence	Velikost produktu
PH-F	5'-CCTAACTTAATGTAAGGTCTCT-3'	338 bp
PH-R	5'-ACATATCCCAGACTACGTGTTT-3'	

Tabulka 15: Teplotní podmínky PCR reakce.

Proces	Teplota [°C]	Čas[min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	5,00	1
Denaturace	95	0,30	35
Nasedání primerů	52 (primery TF-F1,TF-R1)	0,30	
	58 (primery TF-F2,TF-R2)		
	60 (primery PH)		
Polymerace	72	0,30	
Závěrečná polymerace	94	5,00	1
	15	neomezeně	

4.4. Zpracování sekvenačních dat

4.4.1. Fylogenetické analýzy

Orální trichomonády

Získaná sekvence ITS1-5.8S rRNA-ITS2 kmene OCa1 byla použita pro vyhledání homolgních sekvencí v databázi NCBI pomocí programu BLAST. Dataset 45 získaných sekvencí izolovaných z 8 koček a 37 psů byly poté porovnány s 50-ti sekvencemi v úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2 příbuzných druhů trichomonád (obrázek 13). Sekvence byly alignovány v souboru programů Genious v. 7.0.5 pomocí programu ClustaW. Alignment byl poté manuálně upraven. Výsledná délka „alignmentu“

činila 294 bp. Optimální substituční modely byly testovány v programu jModelTest 2 (Darriba *et al.* 2012) a PhyML (Guindon & Gascuel 2003). K fylogenetické analýze byla použita metoda „maximum likelihood“ v programu PhyML s použitím GTR+I+ Γ modelu a bootstrapovou analýzou s 1000 pseudoreplikáty, Bayesovská metoda (model GTR+I+ Γ , chain length 1,100,000; heated chains 4, heated chain temperature 0,3; burn in length 100,000) (Huelsenbeck & Ronquist 2001) a metoda „maximum parsimony“ v programu PAUP v.4.0b (Swofford 2002).

Střevní trichomonády

Sekvence ITS-5.8S rRNA-ITS2 *T. foetus* získané ze tří izolátů z koček byly porovnány se sekvencí *T. foetus* izolovanou ze skotu (AF339736) a z kočky (AF466750). Sekvence byly porovnány za použití souboru programů Genious v programu ClustalW.

4.5. Statistická analýza a vyhodnocení dotazníků

Statistické analýzy byly provedeny v programu R, verze 3.1.0 (© The R Foundation for Statistical Computing 2008). Prevalence trichomonád u psů a koček v České republice byla vypočítána s 95 % intervalem spolehlivosti (95 % CI) testem *prop.test*. Epidemiologická data sloužila ke stanovení souvislostí mezi demografickými faktory, zdravotními faktory a nákazou trichomonádami. Tuto souvislost zjišťovala pravděpodobnost onemocnění u skupiny jedinců exponovaných nějakému faktoru, ale i u skupiny neexponovaných. Tato pravděpodobnost byla modelována logistickou regresí v programu R (<http://www.R-project.org>) a byl vypočten křížový poměr (odds ratio OR), který je založen na pojmu „šance na onemocnění“ (Procházka 1999). Stepwise logistická regrese byla použita pro stanovení nejsilnějších asociací mezi faktory a její výsledek byl odečítán jako signifikantní nejméně na 5 % hladině (*P*). Přesnost odhadu poměru šancí onemocnění popisuje 95 % interval spolehlivosti intervalu (95 % CI) (Procházka 1999; Procházka 2014).

5. VÝSLEDKY

Tato studie byla zaměřena na identifikaci trichomonád žijících v ústní dutině (tzv. orální trichomonády) a v zažívacím traktu (tzv. střevní trichomonády) u psů a koček v České republice. Důraz byl kladen na identifikaci patogenního druhu *Tritrichomonas foetus*, jehož výskyt u psů a koček v ČR zatím nebyl zaznamenán. Prokázání a rozlišení trichomonád u psů a koček v této práci spočívalo ve třech krocích: 1) sběr vzorků a informací o odebraném zvířeti (epidemiologický dotazník – příloha 1 a 2), 2) detekce trichomonád pomocí kultivace a nested PCR a 3) druhová identifikace trichomonád pomocí sekvence DNA oblasti ITS1-5.8S rRNA-ITS2.

5.1. Orální trichomonády

Odběr vzorků probíhal od prosince 2012 do prosince 2013. Vzorky byly odebírány na kultivaci a nested PCR, tak aby se dala porovnat senzitivita použitých metod. Pro diagnostiku orálních trichomonád bylo odebráno 126 vzorků výtěrů dutiny ústní ze psů a 135 vzorků z koček. Zpočátku byly odebírány vzorky pouze pro kultivaci (27 u psů a 37 u koček), později i pro nested PCR (99 u psů a 94 u koček). Čtyři vzorky byly získány pouze pro nested PCR. Při odběru výtěrů z dutiny ústní bylo dbáno na důkladný stěr ze sliznice, dásní a z okolí zubů. Protože jsme zprvu nepředpokládali přítomnost více druhů trichomonád v orální dutině psů a koček, založili jsme molekulární diagnostiku na nested PCR za použití obecných primerů, které nerozlišují druh trichomonád. Po sekvenci náhodně vybraných izolátů jsme však zjistili přítomnost více druhů, a proto jsme se pokusili zpětně ze získaného materiálu sekvenovat další izoláty. Sekvence se však podařila s výrazně menším počtem vzorků, které byly pozitivní metodou nested PCR. Pro hodnocení prevalence a demografických faktorů jsme proto použili jak data získaná bez rozlišení druhů, tak odděleně pro dva zjištěné druhy.

5.1.1. Charakteristika studovaných populací

Odběr vzorků byl proveden zcela náhodně z různých skupin psů a koček. Charakteristika vyšetřovaného zvířete byla vyplněna do dotazníku. Mezi zjišťované údaje patřili: *pohlaví, věk, plemeno, lokalita-kraj, způsob ubytování*, zda jsou jedinci chováni po jednom nebo více a *typ chovu*, tedy zda zvíře pochází z útulku nebo z domácnosti od majitele (příloha 3). Psi a kočky byli rozděleni do dvou věkových kategorií podle dospívání na jedince mladší tří let a jedince starší tří let. Dále byl zaznamenán zdravotní stav zvířete, kdy byla zvířata přiřazována do tří skupin: *zubní potíže, respirační potíže a jiná onemocnění*. Skupina se *zubními potížemi* zahrnovala všechna zvířata s mírným až pokročilým zubním kamenem, s gingivitidami až periodontálními onemocněními. Pokud byla dutina ústní zdravá, bez zubního kamene a bez načervenalých dásní, byl jedinec označen tak, že je *bez zubních potíží*. Skupina s *respiračními potížemi* zahrnovala zvířata, která trpěla na rýmy, astma,

kašel a záněty dýchacích cest. Pokud jedinci měli diagnostikovanou nějakou jinou nemoc nebo byli léčeni, byli zahrnuti do skupiny *jiná onemocnění*. Poslední zjišťovanou informací bylo, zda jsou zvířata odčervena.

Psi

Výtěr z dutiny ústní a epidemiologický dotazník byl získán od 126 psů (tabulka 16, příloha 3). Vyšetřovaní psi byli z 61,1 % samci a z 38,9 % samice, jejich věk se pohyboval v rozmezí od jednoho měsíce do šestnácti let (průměr 5,1 let). Bylo studováno 47,6 % psů mladší tří let 52,4 % psů starší tří let. Studovaná populace psů zahrnovala 50 % kříženců a 50 % psů čistých plemen (s průkazem původu – PP, i bez PP). Vyšetřovaná plemena pojímala malá plemena, střední i velká (od yorkšírského teriéra přes border kolie až po kavkazského pasteveckého psa). Od 50 majitelů bylo vyšetřeno 60,3 % psů, počet psů v jedné domácnosti se pohyboval od jedné do pěti (průměr 1,12) a celkem 39,7 % psů bylo vyšetřeno z 6 útulků (Liberec, Frýdlant, Lučany, Česká lípa, Kolín, Poděbrady). Ve většině útulků žili psi odděleně, pouze ve dvou případech žili všichni psi společně - Lučany (n=10) a Česká lípa (n=2). Dohromady s více jak jedním psem žilo 69 % vyšetřovaných psů, samostatně po jednom bylo chováno 31 % psů. Vyšetřovaní psi pocházeli z šesti krajů České republiky, 32,5 % z Prahy, 31 % ze Středních Čech, 23,8 % z Liberecka a z ostatních krajů kolem 5 %. Veterinárním lékařem bylo odebráno 10,3 % vzorků (Veterinární klinika ERIKA, Praha 8 a Veterinární klinika Počernice, Praha 9).

Podle onemocnění byli psi rozděleni do tří skupin: 1) psi se *zubními potížemi* (31,7 %), 2) psi s *respiračními potížemi* (4,8 %) a 3) psi s *jiným onemocněním* (17,5 %). Skupina psů s *jiným onemocněním* zahrnovala psy s plísněmi v uších, nádory, mastocyty, záněty prostaty a močových cest, kožní a srdeční choroby, gastroenteritidy, mozkové příhody a epilepsie. Zdravých psů bez jakéhokoli onemocnění bylo 46 %. Odčerveno bylo 91,3 % vyšetřených psů.

Tabulka 16: Charakteristika vyšetřované populace psů.

Charakteristika populace		Počet psů	Podíl psů
Pohlaví	<i>Samec</i>	77	61,1 %
	<i>Samice</i>	49	38,9 %
Věk	<i>< 3 roky</i>	60	47,6 %
	<i>> 3 roky</i>	66	52,4 %
Plemeno	<i>Čistokrevní</i>	63	50,0 %
	<i>Kříženci</i>	63	50,0 %
Typ chovu	<i>Majitel</i>	76	60,3 %
	<i>Útulek</i>	50	39,7 %
Ubytování	<i>> 2 jedinců</i>	87	69,0 %
	<i>1 jedinec</i>	39	31,0 %
Kraj	<i>Praha</i>	41	32,5 %
	<i>Středočeský</i>	39	31,0%
	<i>Liberecký</i>	30	23,8 %
	<i>Královéhradecký</i>	7	5,6 %
	<i>Pardubický</i>	3	2,4 %
	<i>Ústecký</i>	6	4,8 %
Zubní potíže	<i>Ano</i>	40	31,7 %
	<i>Ne</i>	86	68,3 %
Respirační potíže	<i>Ano</i>	6	4,8 %
	<i>Ne</i>	120	95,2 %
Jiná onemocnění	<i>Ano</i>	22	17,5 %
	<i>Ne</i>	104	82,5 %
Odčervení	<i>Ano</i>	115	91,3 %
	<i>Ne</i>	11	8,7 %

Kočky

Výtěr z dutiny ústní a epidemiologický dotazník byl získán od 135 koček (tabulka 17, příloha 3). Vyšetřované kočky byly z 57,8 % samci a ze 42,2 % samice, jejichž věk se pohyboval v rozmezí od dvou měsíců do dvanácti let (průměr 2,9 roku). Koček mladších tří let bylo 69,6 % koček a koček starších tří let bylo 30,4 % koček. Studovaná populace zahrnovala 71,1 % koček domácích (kříženců) a 28,9 % čistokrevných zahrnujících 12 plemen (většinou s PP). Od 60 majitelů bylo vyšetřeno 65,2 % koček, počet odebraných koček na domácnost se pohyboval od jedné do šesti (průměr 1,5). Celkem 34,8 % koček pocházelo ze sedmi útulků (Praha 2x, Český brod, Liberec, Frýdlant, Lučany, Česká lípa). Ve většině útulků žily kočky odděleně ve skupinách, z každé skupiny byla vyšetřena jedna až dvě kočky. S více jak jednou kočkou dohromady žilo 77 % vyšetřených koček, samostatně žilo 23 % koček. Vyšetřované kočky pocházely ze sedmi krajů České republiky, 45,2 % z Prahy, 13,3 % ze Středních Čech, 26,7 % z Liberecka a z ostatních krajů do 5 %. Veterinárním lékařem bylo odebráno 24,4 % vzorků.

Zubní potíže byly pozorovány u 14,8 % koček, respiračními potížemi trpělo 17,8 % koček a 25,9 % trpělo jinými onemocněními (nádory, kalcivirus, panleukopenie, zánět močových cest a ledvin, zánět hrudníku, zažívací problémy, giardióza). Zdravých koček bylo 41,5 %. Odčerveno bylo 79,3 % vyšetřených koček.

Tabulka 17: Charakteristika vyšetřované populace koček.

Charakteristika populace		Počet koček	Podíl koček
Pohlaví	<i>Samec</i>	78	57,8 %
	<i>Samice</i>	57	42,2 %
Věk	<i>< 3 roky</i>	94	69,6 %
	<i>> 3 roky</i>	41	30,4 %
Plemeno	<i>Čistokrevní</i>	39	28,9 %
	<i>Kříženci</i>	96	71,1 %
Typ chovu	<i>Majitel</i>	88	65,2 %
	<i>Útulek</i>	47	34,8 %
Ubytování	<i>> 2 jedinců</i>	104	77,0 %
	<i>1 jedinec</i>	31	33,0 %
Kraj	<i>Praha</i>	61	45,2 %
	<i>Středočeský</i>	18	13,3 %
	<i>Liberecký</i>	36	26,7 %
	<i>Královéhradecký</i>	5	3,7 %
	<i>Pardubický</i>	6	4,4 %
	<i>Karlovarský</i>	3	2,2 %
	<i>Ústecký</i>	6	4,4 %
Zubní potíže	<i>Ano</i>	20	14,8 %
	<i>Ne</i>	115	85,2 %
Respirační potíže	<i>Ano</i>	24	17,8 %
	<i>Ne</i>	111	82,2 %
Jiná nemoc	<i>Ano</i>	35	25,9 %
	<i>Ne</i>	100	74,1 %
Odčervení	<i>Ano</i>	107	79,3 %
	<i>Ne</i>	28	20,7 %

5.1.2. Detekce trichomonád

Orální trichomonády byly detekovány pomocí kultivace a molekulární metodou nested PCR.

Kultivace

Psi

Kultivačně bylo testováno 126 výtěrů z dutiny ústní psů a z toho 45 výtěrů bylo pozitivních na orální trichomonády. Jednotlivé kmeny trichomonád byly označeny značkou OCaX, kde O = oral, Ca = *Canis*, X = pořadové číslo (tabulka 19). Z 39 kultur se podařila izolovat DNA, 6 kultur se nepodařilo udržet. V kapalném dusíku bylo zamraženo 23 kmenů orálních trichomonád. V kultuře OCa15 byl zjištěn dvojitý produkt sekvenace, který odpovídal dvou druhům trichomonád (*Trichomonas tenax* a *Trichomonas* sp.).

Kočky

Z dutiny ústní koček bylo kultivováno 131 výtěrů, z toho bylo 12 kultur pozitivních na orální trichomonády. Jednotlivé kmeny trichomonád byly označeny jako OFeX, kde O = oral, Fe = *Felis*, X = pořadové číslo (tabulka 20). Do tekutého dusíku bylo zamraženo 8 kmenů orálních trichomonád z koček. Ze všech 12 kultur trichomonád byla izolována DNA.

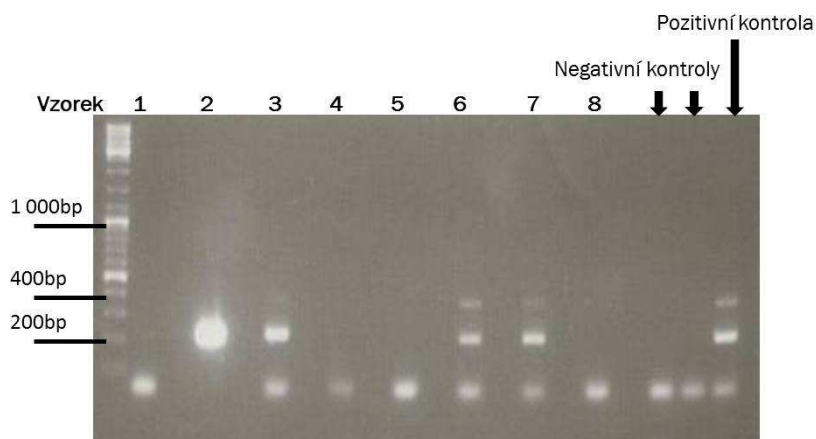
Nested PCR

K vyšetření vzorků na přítomnost trichomonád byla použita metoda nested PCR, která zahrnovala dva páry primerů (ITS-F, ITS-R a TFITS-F a TFITS-R). Tyto primery amplifikovaly fragmenty oblasti ITS1-5.8S rRNA-ITS2 u trichomonád bez druhové specifity (obrázek 9) o velikosti 350 a 208 bp (obrázek 10).

Obrázek 9: Nasedání primerů při amplifikaci oblasti ITS1-5.8S rRNA-ITS2 u trichomonád bez druhové specifity pomocí nested PCR. Gen 18S kóduje rRNA malé ribozomální podjednotky, geny 5.8S a 28S kódují rRNA pro velkou ribozomální podjednotku, všechny geny jsou u trichomonád vysoce konzervativní. ITS oblasti jsou nepřekládané úseky DNA, které jsou variabilní pro rody a druhy trichomonád. ITS-F a ITS-R je první pár primerů, TFITS-F a TFITS-R je druhý pár primerů.

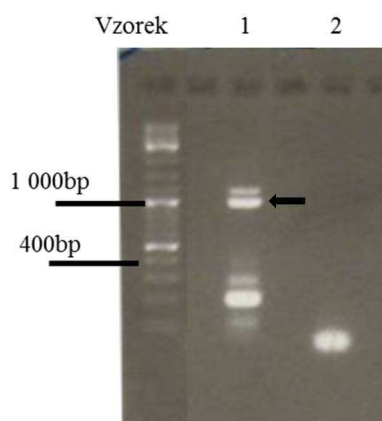


Obrázek 10: Příklad výsledku testu pomocí metody nested PCR. Amplifikované oblasti genů pro ITS1-5.8S rRNA-ITS2 jsou patrné jako pruhy o velikosti 350 a 208 bp. Vzorky č. 2, 3, 6 a 7 jsou pozitivní vzorky na orální trichomonády. Vzorky č. 1, 4, 5 a 8 jsou negativní na přítomnost DNA orálních trichomonád. Negativní kontroly jsou výsledky PCR reakce, do kterých byla přidána voda místo DNA. Pozitivní kontrola obsahuje DNA z orálních trichomonád.



Kontrola izolace DNA byla provedena pomocí primerů navržených na fragment genu pro hemoglobin beta globin (HBB) psa a kočky. Z důvodů podobnosti tohoto genu u psa i kočky, byl navržen jeden pár primerů pro oba druhy. Amplifikace DNA psa a kočky byla úspěšná u všech vzorků, které byly negativní na orální trichomonády. Příklad amplifikace fragmentu genu pro HBB je na obrázku 11.

Obrázek 11: Amplifikace fragmentu genu pro HBB u kočky ve vzorku, který byl negativní na přítomnost orálních trichomonád. Vzorek č. 1 je pozitivní na přítomnost genu kočky, šipka ukazuje na amplifikovaný fragment DNA HBB o velikosti 978 bp. Vzorek č. 2 představuje negativní kontrolu, do které byla přidána voda místo DNA.



Pomocí metody nested PCR bylo celkem vyšetřeno 99 vzorků psů, z nichž 39 bylo pozitivních na přítomnost orálních trichomonád (tabulka 18). U koček bylo zjištěno z 98 vzorků 20 pozitivních (tabulka 18).

Tabulka 18: Přehled vyšetřených vzorků molekulární metodou. Z tabulky je vidět, že metoda molekulární diagnostiky je vhodnější k detekci organismu, než ke zpětnému určení do druhu.

	Psi	Kočky
Počet vzorků	99	98
Počet pozitivních	39	20
Počet identifikovaných trichomonád	4 z 16	1 z 14

Tabulka 19: Přehled izolovaných kmenů Trichomonád z dutiny ústní psů. M-samec, F-samice.

Charakteristika vyšetřenoého psa					Výsledek diagnostiky	
Kmen	Pohlaví	Měsíc	Plemeno	Původ	Nested PCR	Kultivace
OCa1	M	11	Kříženec	Praha	-	pozitivní
OCa2	M	11	Kříženec	Praha	-	pozitivní
OCa3	F	72	Německý ovčák	Dvůr Králové nad Labem	-	pozitivní
OCa4	M	8	Kříženec	Praha	-	pozitivní
OCa5	M	12	Německý ovčák	Ptice	-	pozitivní
OCa6	M	36	Německý ovčák	Ptice	-	pozitivní
OCa7	M	24	Kříženec	Praha	-	pozitivní
OCa8	F	120	Kříženec	Praha	-	pozitivní
OCa9	F	168	Kokršpaněl	Praha	-	pozitivní
OCa10	M	96	Border Kolie	Praha	pozitivní	pozitivní
OCa11	F	132	Stafford	Praha	pozitivní	pozitivní
OCa12	F	96	Kříženec	Lučany Jablonec nad Nisou	negativní	pozitivní
OCa13	M	48	Kříženec	Lučany Jablonec nad Nisou	pozitivní	pozitivní
OCa14	F	72	Kříženec	Lučany Jablonec nad Nisou	pozitivní	pozitivní
OCa15	F	96	Kříženec	Lučany Jablonec nad Nisou	negativní	pozitivní
OCa16	F	84	Kříženec	Lučany Jablonec nad Nisou	pozitivní	pozitivní
OCa17	F	120	Kříženec	Lučany Jablonec nad Nisou	pozitivní	pozitivní
OCa18	M	48	Kříženec	Lučany Jablonec nad Nisou	pozitivní	pozitivní
OCa19	F	60	Kříženec	Lučany Jablonec nad Nisou	pozitivní	pozitivní
OCa20	F	96	Kříženec	Praha	pozitivní	pozitivní
OCa21	M	120	Kříženec	Praha	pozitivní	pozitivní
OCa23	F	16	Teriér	Kladno	pozitivní	pozitivní
OCa24	M	16	Teriér	Kladno	pozitivní	pozitivní
OCa25	F	192	Kříženec	Jirkov	negativní	pozitivní
OCa26	M	192	Kříženec	Jirkov	pozitivní	pozitivní
OCa27	M	96	Německý ovčák	Frýdlant	negativní	pozitivní
OCa28	F	156	Kříženec	Frýdlant	pozitivní	pozitivní
OCa29	M	120	Kříženec	Frýdlant	pozitivní	pozitivní
OCa30	M	120	Kříženec	Liberec	pozitivní	pozitivní
OCa31	F	84	Kříženec	Liberec	pozitivní	pozitivní
OCa32	F	96	Kříženec	Liberec	pozitivní	pozitivní
OCa34	M	96	Kříženec	Kolín	pozitivní	pozitivní
OCa35	M	24	Knírač velký	Poděbrady	pozitivní	pozitivní
OCa37	M	72	Kříženec	Liberec	pozitivní	pozitivní
OCa37	F	72	Chodský pes	Poděbrady	pozitivní	pozitivní
OCa38	M	192	Kříženec	Ústí nad Labem	pozitivní	pozitivní
OCa40	M	24	Kříženec	Praha	negativní	pozitivní
OCa41	F	144	Labrador	Lázně Bohdaneč	negativní	pozitivní
OCa42	F	132	Labrador	Lázně Bohdaneč	pozitivní	pozitivní
OCa43	F	108	Labrador	Lázně Bohdaneč	negativní	pozitivní
OCa45	M	36	Kříženec	Praha	pozitivní	pozitivní
OCa46	F	48	Mops	Ústí nad Labem	pozitivní	negativní

Tabulka 20: Přehled izolovaných kmenů Trichomonád z dutiny ústní koček. M-samec, F-samice.

Charakteristika vyšetřené kočky					Výsledek diagnostiky	
Kmen	Pohlaví	Měsíc	Plemeno	Původ	Nested PCR	Kultivace
OFe1	M	4	Sphynx	Praha	-	pozitivní
OFe2	F	24	Turecká angora	Praha	-	pozitivní
OFe3	M	5	Turecká angora	Praha	-	pozitivní
OFe4	F	36	Britská kočka	Praha	-	pozitivní
OFe5	M	48	Kříženec	Praha	pozitivní	pozitivní
OFe6	M	72	Kříženec	Praha	pozitivní	pozitivní
OFe7	F	96	Kříženec	Praha	pozitivní	negativní
OFe8	M	48	Kříženec	Teplice	pozitivní	pozitivní
OFe9	M	12	Mainská mývalí	Mariánské lázně	pozitivní	pozitivní
OFe10	M	24	Donský Sphynx	Lázně Bohdaneč	pozitivní	pozitivní
OFe11	F	19	Siamská kočka	Praha	negativní	pozitivní
OFe12	F	48	Donský Sphynx	Lázně Bohdaneč	pozitivní	pozitivní
OFe13	M	72	Donský Sphynx	Lázně Bohdaneč	negativní	pozitivní

Porovnávání metod diagnostiky

U psů bylo vyšetřeno 99 vzorků současně oběma metodami, z toho bylo 48 pozitivních. U 27 vzorků byla zjištěna pozitivita oběma metodami současně. Kultivací bylo zjištěno 36 (75 %) a pomocí nested PCR 39 (81 %) pozitivních vzorků. U koček bylo diagnostikováno 94 vzorků, ze kterých bylo 21 pozitivních. U 6 vzorků byla zjištěna pozitivita oběma metodami současně. Kultivací bylo zjištěno 8 (38 %) pozitivních vzorků a pomocí nested PCR bylo zjištěno 19 (91 %) pozitivních vzorků (tabulka 21).

Tabulka 21: Porovnání metod diagnostiky při vyšetřování na orální trichomonády.

Výsledek diagnostiky	Počet vyšetřených vzorků na orální trichomonády					
	<i>Psi (n=48)</i>			<i>Kočky (n=20)</i>		
	Kultivace	Nested PCR	Současně	Kultivace	Nested PCR	Současně
pozitivní	36	39	27	8	20	6

5.1.3. Druhov identifikace

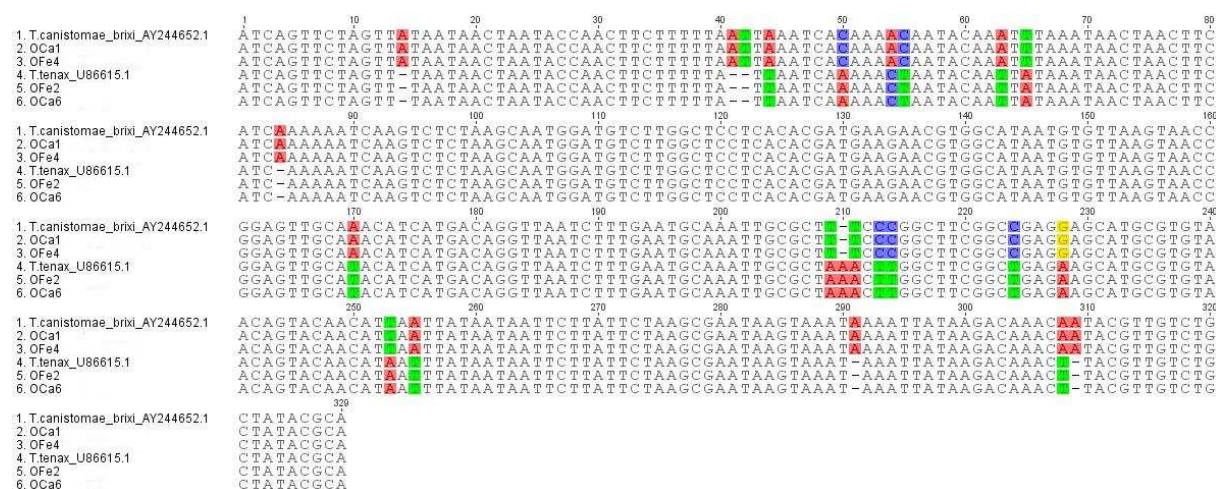
Druh orálních trichomonád u psů a koček byl primárně určen na základě srovnávací analýzy sekvencí genů pro ITS1-5.8S rRNA-ITS2. Tato analýza měla ukázat, zda trichomonády u psů a koček lze odlišit na základě těchto sekvencí a zda u těchto hostitelů jsou přítomné trichomonády rodu *Tetratrichomonas* dle původního popisu Hegnera a Ratcliffa (1927a,b) nebo rodu *Trichomonas* dle Kutišové *et al.* (2005). Výsledky sekvencí překvapivě ukázaly, že trichomonády jak u psů, tak u koček lze rozdělit do dvou skupin, které odpovídají rodu *Trichomonas* (tabulka 22). První skupina zahrnovala 9 sekvencí trichomonád získaných ze psů a 5 z koček, které byly 100 % identické s druhem *Trichomonas tenax* (U86615.1). Ve druhé skupině bylo zahrnuto 34 sekvencí trichomonád ze psů a 8 z koček, které byly 100 % identické s izolátem BRIXI (AY244652) (Kutišová *et al.* 2005). Přestože je v databázi NCBI tato sekvence označena jako *Trichomonas canistomae*, bude dále v textu používán název *Trichomonas* sp.

Tabulka 22: Zjištěné druhy trichomonád u psů a koček.

Druhy trichomonád	Množství zjištěných trichomonád	
	U psů (n = 43)	U koček (n = 13)
<i>Trichomonas</i> sp.	34 (79,1 %)	8 (61,5 %)
<i>Trichomonas tenax</i>	9 (20,9 %)	5 (38,6 %)

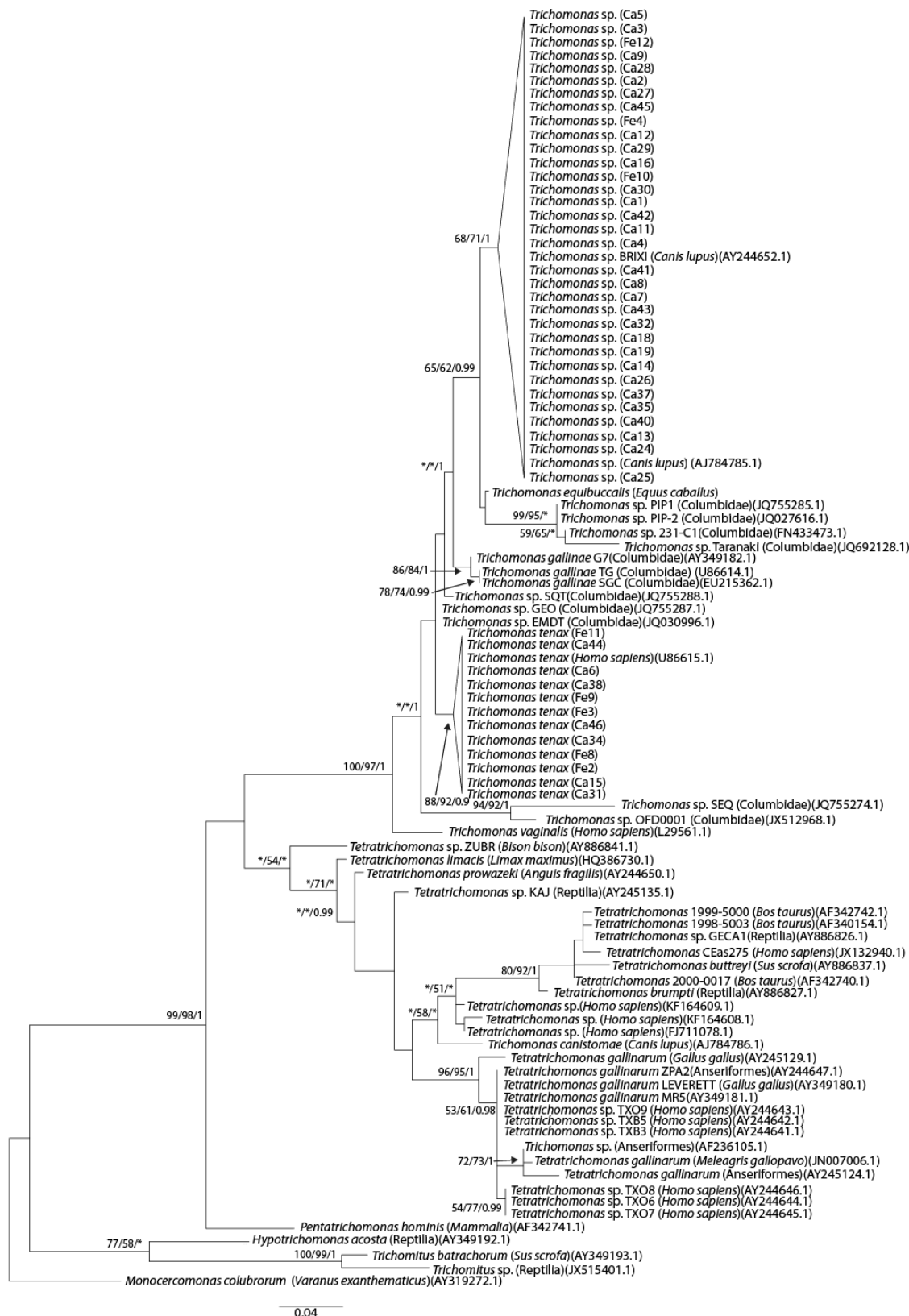
T. tenax a *Trichomonas* sp. je možné odlišit na základě sekvenční úseku genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2, který je odlišný v 6 % nukleotidů. Charakteristické delece a konverze nukleotidů jsou konzervované pro oba dva typy trichomonád na 23 pozicích analyzovaného úseku genu (obrázek 12).

Obrázek 12: Srovnání sekvencí úseku genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2 u vybraných zástupců trichomonád izolovaných z orální dutiny psů (OCa1, OCa6) a koček (OFe2, OFe4), které patří do skupiny *T. tenax* a *Trichomonas* sp.



Přítomnost dvou typů orálních trichomonád psů a koček potvrdila fylogenetická analýza úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (obrázek 13). K této analýze bylo použito 45 kmenů OCa a OFe. Trichomonády spadaly do dvou monofyletických taxonů. První skupina trichomonád spadala k izolátu „*Trichomonas canistomae*“ BRIXI (AY244652). Na sesterské pozici byla skupina, kterou tvořily trichomonády izolované z ústní dutiny koně (*T. equibuccalis*) a *Trichomonas* sp. izolovaných z holubovitých ptáků. Druhou skupinu tvořily trichomonády izolované z ústní dutiny psů a koček společně s lidským komenzálem *Trichomonas tenax* (U86615.1).

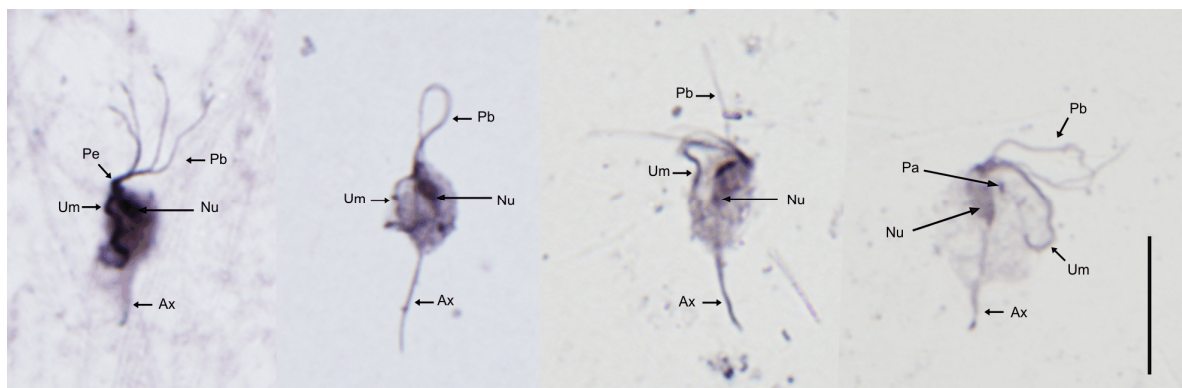
Obrázek 13: Fylogenetická analýza ITS1-5.8S rRNA-ITS2 orálních trichomonád, byla provedena metodou maximum likelihood, maximum parsimony a Bayesovskou metodou. Strom byl zakořeněn druhem *Monocercomonas colubrorum*. Čísla v uzlech představují hodnotu bootstrapové podpory/max parsimony/Bayesovy posteriorní pravděpodobnosti. Hodnoty < 50/50/0.90 jsou označeny *.



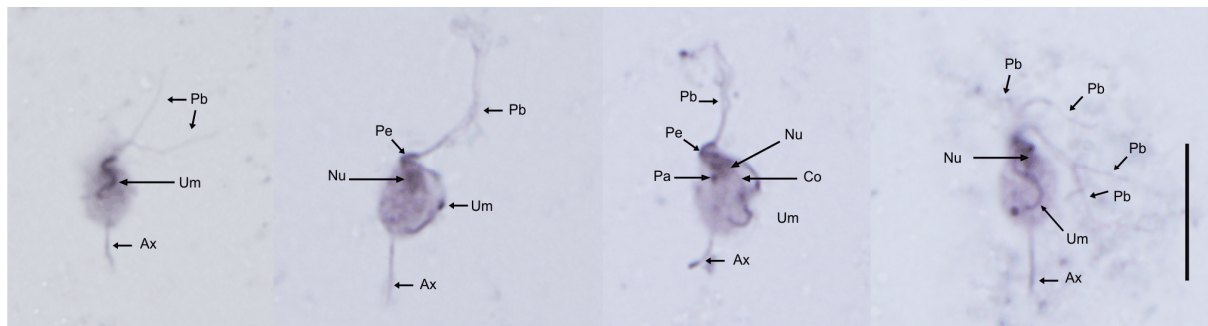
Morfologie

Orální trichomonády izolované v této práci patří na základě sekvencí ITS1-5.8S rRNA-ITS2 do dvou druhů rodu *Trichomonas*. Abychom se ujistili, že se jedná o rod *Trichomonas* a nikoliv o rod *Tetratrichomonas* dle původního popisu Hegnera a Ratcliffa (1927a, b), studovali jsme vybrané izoláty orálních trichomonád mikroskopicky. Na obrázku 14 a 15 jsou zachyceny morfologické znaky izolovaných trichomonád po obarvení protargolem. Kmen OCa25 *Trichomonas* sp. je charakteristický čtyřmi předními bičíky a jedním zpětným bičíkem tvořícím undulující membránu lamelifornního typu. Undulující membrána je zakončena ve 2/3 buněčného těla. Zpětný bičík nepokračuje volnou částí. Axostyl je tenký a dlouhý a parabazální aparát je tyčovitý. Stejná morfologická struktura kmene OFe2 *Trichomonas tenax* je vidět na obrázku 15. Druhy *T. tenax* a *Trichomonas* sp. nelze tedy na základě morfologie odlišit. Ultrastruktura *Trichomonas* sp. je v detailech zobrazena v obrázku 16. V přední části buňky (a) jsou zachyceny tři z pěti bazálních tělísek bičíků. Bazální tělíska 1 a 3 jsou asociovány s hákovitě zahnutými lamelami (L1 a L3), které jsou vinuty po směru hodinových ručiček. Bazální tělíska 2 je spojeno s pelta-axostylárním komplexem pomocí sigmoidální lamely. Na obrázku je zřetelně vidět pelta, která kryje bazální tělíska, dvě parabazální fibrily a kosta. Na dalším obrázku (b) je zobrazen průřez čtyř předních bičíků charakterizující rod *Trichomonas*. Pro rod *Trichomonas* je také typické nasedání zpětného bičíku k undulující membráně z boku (d) tzv. lamelifornní typ undulující membrány. Detailní struktura kosty (f) potvrzuje typ B. Dále jsou na obrázku zachyceny hydrogenozómy s dobře viditelnou dvojitou membránou. Pohled na celou buňku, kde je zachycen axostyl procházející buňkou je na obrázku (c).

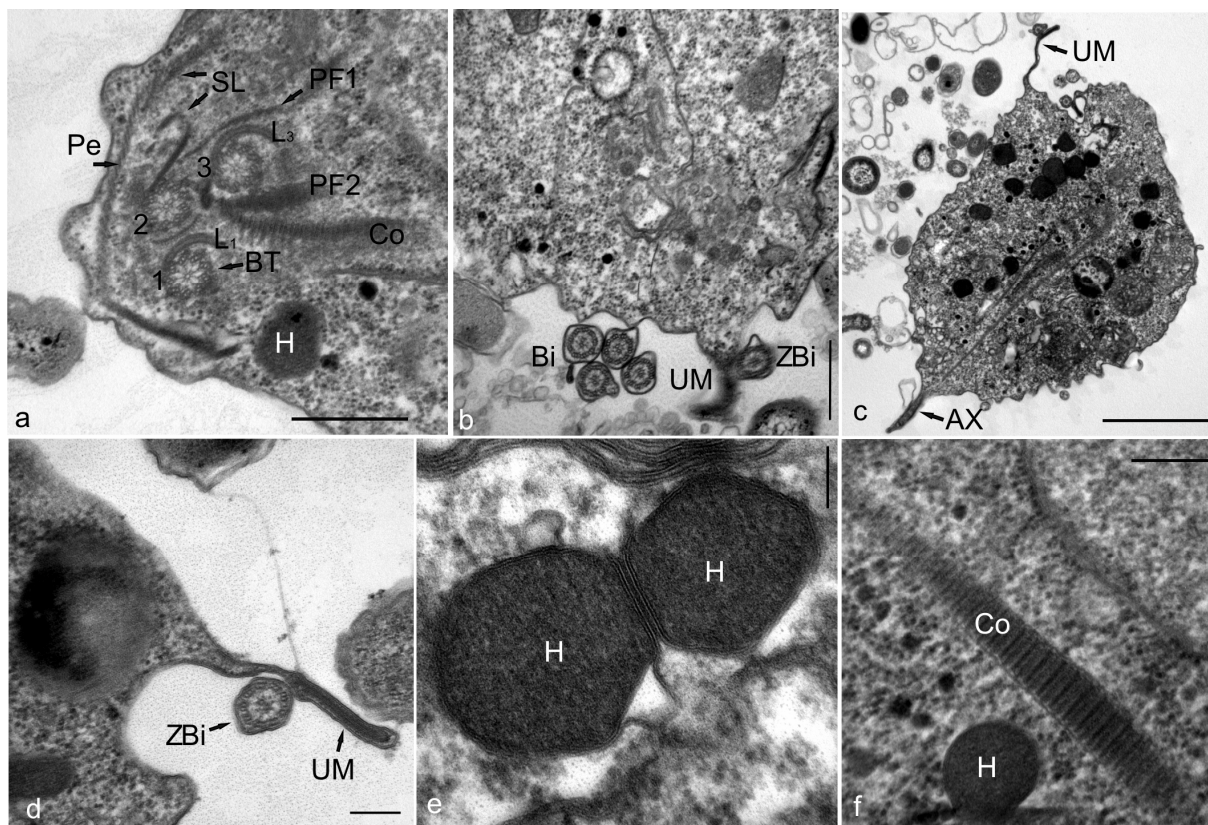
Obrázek 14: Izolát OCa25, *Trichomonas* sp. obarvený protargolem. Charakteristické znaky *Trichomonas* sp.: 4 přední bičíky, dlouhý tenký axostyl, undulující membrána ukončená ve 2/3 buňky, Ax – axostyl, Pa – parabazální aparát, Pe – pelta, Pb – přední bičík, Nu – nucleus, Um – undulující membrána. Měřítko je 10 μm .



Obrázek 15: Izolát OFe2, *Trichomonas tenax* obarvený protargolem. Ax – axostyl, Co – kosta, Pe – pelta, Pa – parabazální aparát, Pb – přední bičík, Nu – nucleus, Um – undulující membrána. Měřítka je 10 μm .



Obrázek 16: Ultrastruktura *Trichomonas* sp. a) Pohled na přední část buňky. Je zde zachyceno bazální tělíčko 1 a 3 s hákovitou lamelou (L1 a L3) a bazální tělíčko asociované se sigmoidální lamelou, pelta, 2 parabazální fibrily a kosta. b) Pohled průřez 4 předních bičíků a undulující membrány se zpětným bičíkem. c) Pohled na celou buňku, kde je zachycen axostyl. d) Pohled na zpětný bičík, který adhezuje k záhybu buněčné membrány – lameliforní typ. e) Pohled na hydrogenozómy s dvojitou membránou. f) Pohled na kosta typu B. AX – axostyl, Bi – bičíky, BT – bazální tělíčka, Co – kosta, PF – parabazální fibrila, Pe – pelta, L1, L3 – hákovité lamely bazálních tělísek, UM – undulující membrána, ZBi – zpětný bičík, H – hydrogenozóm. Měřítka u obrázku a, b představuje 0,5 μm , u obrázku c představuje měřítko 2 μm , obrázek d, e, f představuje měřítko 0,2 μm .



Na základě morfologických znaků je evidentní, že nově získaný izolát *Trichomonas* sp. se jednoznačně liší od popsanych druhů *Tetratrichomonas canistomae* u psů a *Tetratrichomonas felistomae* u koček z roku 1927 (Hegner & Ratcliffe 1927a; Hegner & Ratcliffe 1927b) a že patří do rodu *Trichomonas*. Druhy *Trichomonas* sp. a *Trichomonas tenax* však není možné od sebe rozlišit morfologicky. Nicméně sekvenční rozdíl oblasti ITS1-5.8S rRNA-ITS2 je pro odlišení těchto izolátů dostatečný. Na základě uvedených dat se domníváme, že izoláty *Trichomonas* sp. představují nový nepopsaný druh orálních trichomonád koček a psů.

5.2. Střevní trichomonády

Vzorky trusu pro diagnostiku střevních trichomonád byly odebírány z předem stanovené populace psů a koček. Tato populace zahrnovala takové jedince, u kterých byl výskyt *T. foetus* nejpravděpodobnější. Podmínky byly stanoveny na základě informací z literatury o přítomnosti *T. foetus* u koček a u psů (Gookin *et al.* 2005; Gookin *et al.* 2004; Bell *et al.* 2010; Tolbert *et al.* 2012) a zahrnovaly věk a přítomnost abnormální stolice, nejlépe průjem, čistokrevnost a způsob ubytování. Abnormální stolicí jsou myšleny všechny typy konzistence trusu, které nemají tvar a nejsou pevné konzistence, tedy průjmová stolice, řídká, mazlavá a dále stolice vzhledu tzv. „kravského koláče“. Vzorky od zvířat s průjmy byly odebrány výplachem střev veterinárním lékařem. Většina vzorků trusu koček byla odebrána přímo od chovatelů a majitelů, kteří vlastnili čistokrevné kočky po více jak dvou jedincích, anebo jejich kočka trpěla průjmy či abnormální stolicí. Mnoho takových chovatelů bylo osloveno na kočičích výstavách proběhlých v Praze během roku 2013.

5.2.1. Charakteristika studovaných populací

Vzorky trusu pro diagnostiku střevních trichomonád a epidemiologický dotazník (příloha 2) byl získán od 11 psů a 86 koček v České republice. U každého vyšetřeného jedince byly získány tyto informace: *pohlaví, věk, plemeno, lokalita-kraj, způsob ubytování*, zda jsou jedinci chováni po jednom nebo více a *typ chovu*, zda pochází zvíře z útulku nebo z domácnosti od majitele (příloha 4). Psi a kočky byli rozděleni do dvou věkových kategorií: mladší jednoho roku a starší jednoho roku, protože koťata a štěňata, jak bylo popsáno, jsou zaznamenána s vyšším výskytem průjmů a jsou častěji nakažena *T. foetus* (Gunn-Moore *et al.* 2007; Burgener *et al.* 2009; Bell *et al.* 2010). Dále byla zaznamenána přítomnost průjmu či abnormálního trusu (*průjem*) a *jiná onemocnění*. Posledním zjišťovanou informací bylo, zda jsou zvířata odčervena a zda byla léčena antibiotiky (antibakteriální léčiva).

Psi

Zjištěné informace o vyšetřených psech jsou uvedeny v tabulce 23 a v příloze 4. Vzorky trusu psů byly získány z Prahy (Veterinární klinika Erika a Veterinární klinika Praha) (n=7) a z útulků v Liberci (n=2) a ve Frýdlantu (n=2). Všichni vyšetřovaní psi trpěli průjemovým onemocněním. Osm vyšetřených bylo samců a 3 samice. Šest psů bylo mladší jednoho roku, 5 bylo starší. Celkem bylo vyšetřeno sedm kříženců a 4 čistokrevní psi: čivava, labrador, maďarský ohař a československý ovčák.

Tabulka 23: Charakteristika vyšetřované populace psů.

Charakteristika populace		Počet psů	Podíl psů
Pohlaví	<i>Samec</i>	8	72,7 %
	<i>Samice</i>	3	27,3 %
Věk	<i>< 1 rok</i>	6	54,5 %
	<i>> 1 rok</i>	5	45,5 %
Plemeno	<i>Čistokrevní</i>	4	36,4 %
	<i>Kříženci</i>	7	63,6 %
Typ chovu	<i>Majitel</i>	7	63,6 %
	<i>Útulek</i>	4	36,4 %
Ubytování	<i>> 2 jedinců</i>	3	27,3 %
	<i>1 jedinec</i>	8	72,7 %
Kraj	<i>Praha</i>	7	63,6 %
	<i>Liberecký</i>	4	36,4 %
Průjem	<i>Ano</i>	11	100,0 %
	<i>Ne</i>	0	0,0 %
Jiná nemoc	<i>Ano</i>	3	27,3 %
	<i>Ne</i>	8	72,7 %
Odčervení	<i>Ano</i>	9	81,8 %
	<i>Ne</i>	2	18,8 %
Léčba antibiotiky	<i>Ano</i>	4	36,4 %
	<i>Ne</i>	7	63,6 %

Kočky

Trus, výtěr ze střev a epidemiologický dotazník byl získán od 86 koček (tabulka 24, příloha 4). Vyšetřované kočky byly ze 44,2 % samci, ze 43 % samice a 12,8 % bylo neurčeného pohlaví. Věk koček se pohyboval v rozmezí od tří měsíců do deseti let (průměr 2,5 roku). Věková kategorie koček mladší jednoho roku zahrnovala 36 % koček a koček starších jednoho roku bylo 64 % koček. Studovaná populace zahrnovala 65,1 % koček domácích (kříženců) a 34,9 % čistokrevných (většinou s PP). Od 61 majitelů bylo vyšetřeno 70,9 % koček, počet odebraných koček na domácnost se pohyboval od jedné do osmi (průměr 2,5). Celkem 29,1 % koček pocházelo z šesti útulků (Praha 2x, Český brod, Liberec, Frýdlant, Lučany a Česká lípa). Ve většině útulků žily kočky odděleně ve skupinách (od 2 po 20 jedinců), z každé skupiny byla vyšetřena jedna až dvě kočky. Dohromady s více jak jednou kočkou žilo 72,1 % vyšetřených koček, samostatně žilo 27,9 % koček. Vyšetřované kočky pocházely ze šesti krajů České republiky, 52,3 % z Prahy, 22,1 % ze Středních Čech, 20,9 % z Liberecka a z ostatních krajů do 2 %. Veterinárním lékařem bylo odebráno 37,2 % vzorků.

Průjmové onemocnění a abnormální trus byl pozorován u 41,9 % koček, jiné onemocnění mělo 2 % vyšetřovaných koček (nádory, kalcivirus, panleukopenie, zánět močových cest a ledvin, zánět hrudníku, zažívací problémy, giardióza). Odčerveno bylo 80,2 % vyšetřených koček a antibiotickou léčbu prodělávalo 11,6 %.

Tabulka 24: Charakteristika vyšetřované populace koček.

Charakteristika populace		Počet koček	Podíl koček
Pohlaví	<i>Samec</i>	38	44,2 %
	<i>Samice</i>	37	43,0 %
	<i>Neurčeno</i>	11	12,8 %
Věk	<i>< 1 rok</i>	31	36,0 %
	<i>> 1 rok</i>	55	64,0 %
Plemeno	<i>Čistokrevní</i>	30	34,9 %
	<i>Kříženci</i>	56	65,1 %
Typ chovu	<i>Majitel</i>	61	70,9 %
	<i>Útulek</i>	25	29,1 %
Ubytování	<i>> 2 jedinců</i>	62	72,1 %
	<i>1 jedinec</i>	24	27,9 %
Kraj	<i>Praha</i>	45	52,3 %
	<i>Středočeský</i>	19	22,1 %
	<i>Liberecký</i>	18	20,9 %
	<i>Ústecký</i>	2	2,3 %
	<i>Hradecký</i>	1	1,2 %
	<i>Pardubický</i>	1	1,2 %
Průjem	<i>Ano</i>	36	41,9 %
	<i>Ne</i>	50	58,1 %
Jiná nemoc	<i>Ano</i>	13	15,1 %
	<i>Ne</i>	73	84,9 %
Odčervení	<i>Ano</i>	69	80,2 %
	<i>Ne</i>	17	19,8 %
Léčba antibiotiky	<i>Ano</i>	10	11,6 %
	<i>Ne</i>	76	88,4 %

5.2.2. Detekce a identifikace střevních trichomonád

Vzorky trusu byly zpočátku odebírány dvěma způsoby pro kultivační diagnostiku a molekulární diagnostiku, tak aby bylo možné porovnat citlivost metod a pro získání kultury *T. foetus* z koček. Pro diagnostiku *T. foetus* kultivací se ve světě většinou používá InPouchTM TF kultivační systém (Gookin *et al.* 2003), nicméně lze použít i Diamondovo médium TYM s antibiotiky (Gookin *et al.* 2003), které jsme použili v této práci. Množství použitých antibiotik bylo experimentálně optimalizováno.

Kultivace

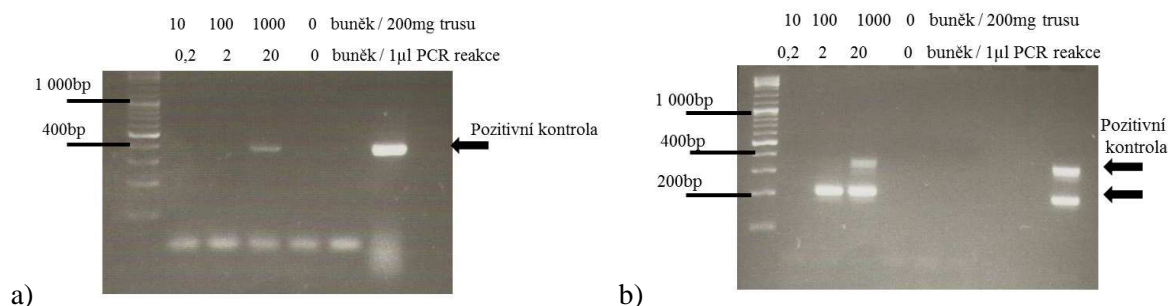
Vzorky z celkového počtu 10 výtěrů z rekta psů a 44 výtěrů z rekta koček byly inokulovány do Diamondova kultivačního média TYM s antibiotiky.

Kromě tří vzorků byly všechny kultivace na střevní trichomonády negativní. Tyto tři vzorky byly odebrány u koček, jejichž trus byl předem určen jako pozitivní pomocí nested PCR. Kultury střevních trichomonád byly axenizovány migrační rourkou a antibiotiky a zamraženy v kapalném dusíku. Ze všech kultur střevních trichomonád byla izolována DNA. Každý kmen byl pojmenován podle jména kočky, ze které byl daný kmen trichomonád izolován: Charlotte, Kitty a Rhap.

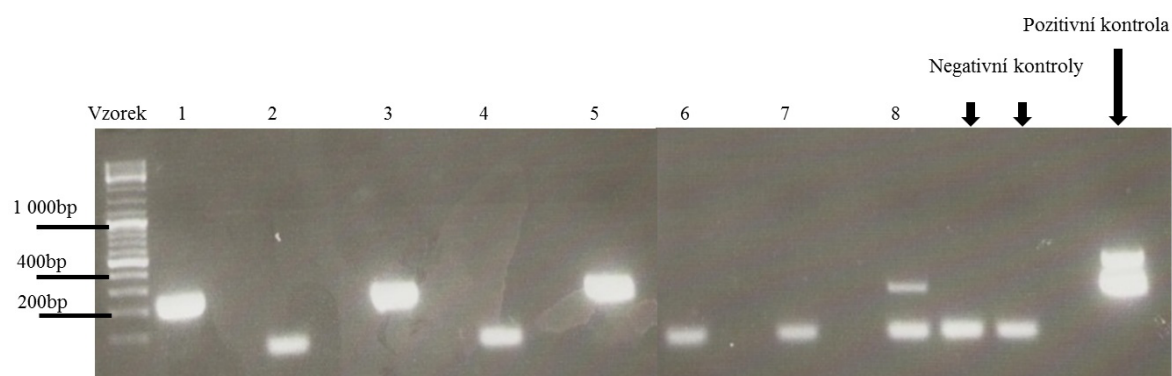
Nested PCR

Vzorky trusu pro nested PCR byly odebrány do etanolu od 11 psů a 71 koček. Detekce střevních trichomonád z trusu psů a koček spočívala v amplifikaci DNA úseku ITS1-5.8S rRNA- ITS2 pomocí nested PCR za použití stejných primerů jako pro vyšetření orálních trichomonád. PCR reakce byla optimalizována pro detekční limit 100 buněk na 200 mg trusu (obrázek 17). Příklad výsledku amplifikace pro 8 vzorků je vidět na obrázku 18. Amplifikované vzorky o velikosti 350 a 208 bp byly odečítány jako pozitivní.

Obrázek 17: Detekční limit nested PCR: a) První PCR reakce s primery ITS-F/ITS-R; b) Druhá PCR reakce s primery TFITS-F/TFITS-R. Do vzorku trusu (200 mg) bylo přidáno 20 μ l s 10, 100 a 1000 buněk *T. foetus*. Pozitivní kontrola obsahovala DNA z kultury *T. foetus*. Jako negativní kontrola byl použit trus bez přidaných buněk *T. foetus*. PCR reakční směs obsahovala 1 μ l extrahované DNA odpovídající koncentraci 0,2, 2 a 20 buněk *T. foetus*. Detekční limit po první reakci byl 20 buněk (a), detekční limit po druhé reakci byl 2 buňky (b).



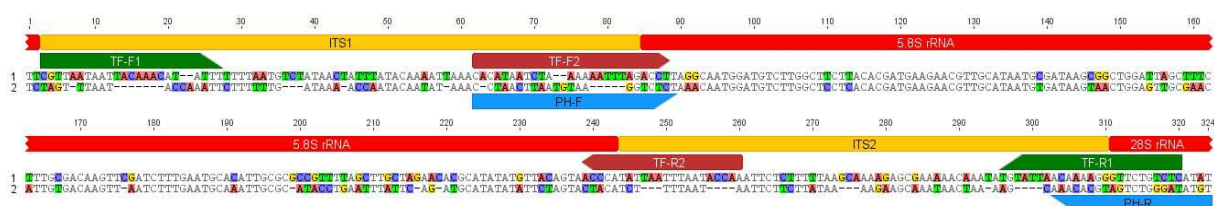
Obrázek 18: Příklad výsledku detekce střevních trichomonád pomocí nested PCR. Vzorky 1, 3, 5, 8 představují pozitivní výsledek, tedy přítomnost DNA střevních trichomonád. Vzorky 2, 4, 6, 7 jsou negativní, nebyla amplifikována žádná DNA trichomonád. Pozitivní kontrola obsahovala DNA z kultury *T. foetus*. Do negativní kontrola byla místo DNA přidána voda.



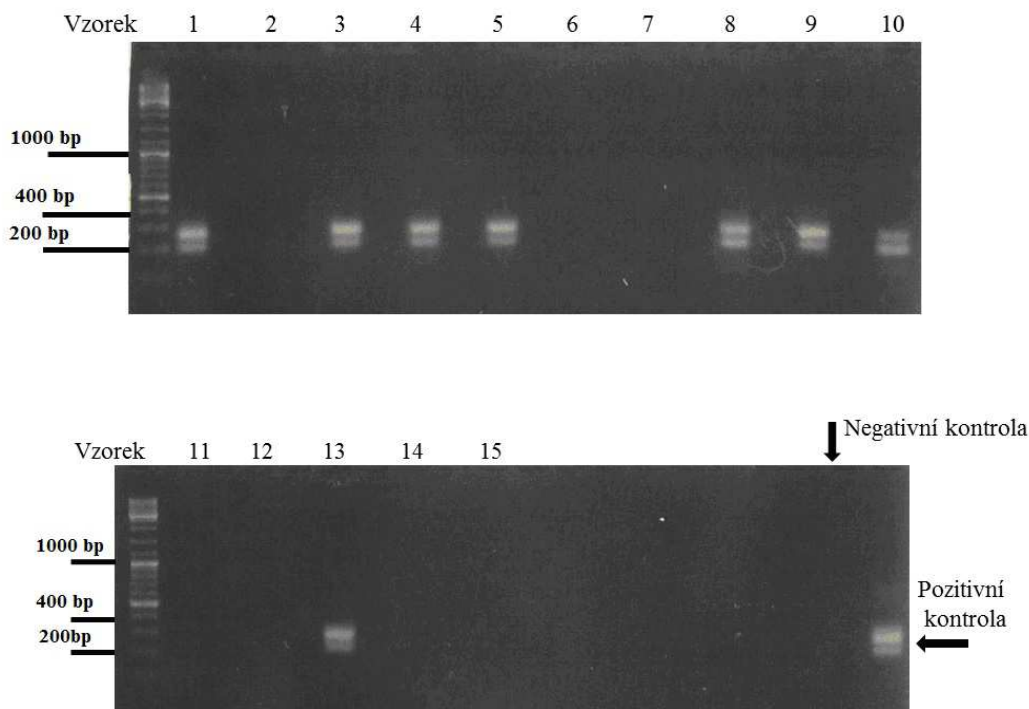
Pomocí nested PCR byly střevní trichomonády diagnostikovány u 4 psů a 31 koček bez rozlišení druhu. Identifikace střevních trichomonád do druhu byla provedena: 1) pomocí nested PCR za použití specifických párů primerů (TF-F1, TF-R1, TF-F2, TF-R2) pro amplifikaci DNA *Trichomonas foetus* v úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (obrázek 19); 2) pomocí PCR za použití specifických primerů pro amplifikaci DNA *Pentatrichomonas hominis* v úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (obrázek 19). Pro amplifikaci *P. hominis* byl navržen pouze 1 pár primerů (PH-F a PH-R), protože nebylo možné na daném úseku genu najít více specifických míst pro nasedání druhého páru primerů. Pro zvýšení citlivosti PCR reakce tak byla PCR opakována dvakrát se stejnými primery (tandemová PCR); 3) pomocí sekvenace DNA v úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2 PCR produktu zaklonovaného do plasmidu TOPO. Identifikace střevních trichomonád do druhu byla provedena způsobem 1 a 2 u tří

pozitivních vzorků ze psa a 27 pozitivních vzorků z koček. Pomocí sekvenace byl identifikován 1 pozitivní vzorek ze psa a 4 pozitivní vzorky z koček. Příklady identifikovaných vzorků se specifickými primery pro *T. foetus* je vidět na obrázku 20, pro *P. hominis* na obrázku 21.

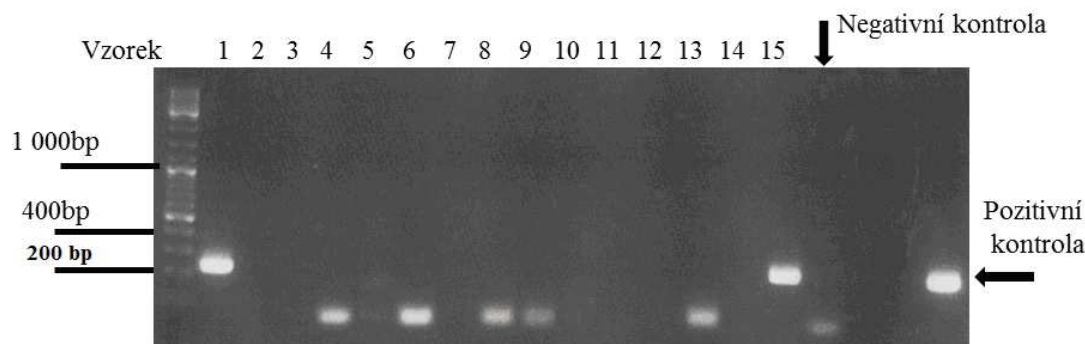
Obrázek 19: Nasedání specifických primerů pro nested PCR TF-F1, TF-R1 a TF-F2, TF-R2 na úsek DNA genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2 *T. foetus* a nasedání specifických primerů PH-F a PH-R na úsek DNA genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2 *P. hominis*. 1. Sekvence genu *T. foetus*, 2. Sekvence genu *P. hominis*. Geny 5.8S a 28S kódují rRNA pro velkou ribozomální podjednotku a ITS oblasti jsou nepřekládané úseky DNA.



Obrázek 20: Příklad výsledku identifikace střevních trichomonád pomocí nested PCR za použití specifických primerů (TF-F1, TF-R1 a TF-F2, TF-R2) pro amplifikaci úseku genu *T. foetus* ITS1-5.8S rRNA-ITS2. Vzorky 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 13 jsou pozitivní, vzorky 2, 6, 7, 11, 12, 14, 15 jsou negativní. Negativní kontrola obsahovala vodu místo DNA. Do pozitivní kontroly byla přidána DNA *T. foetus*.

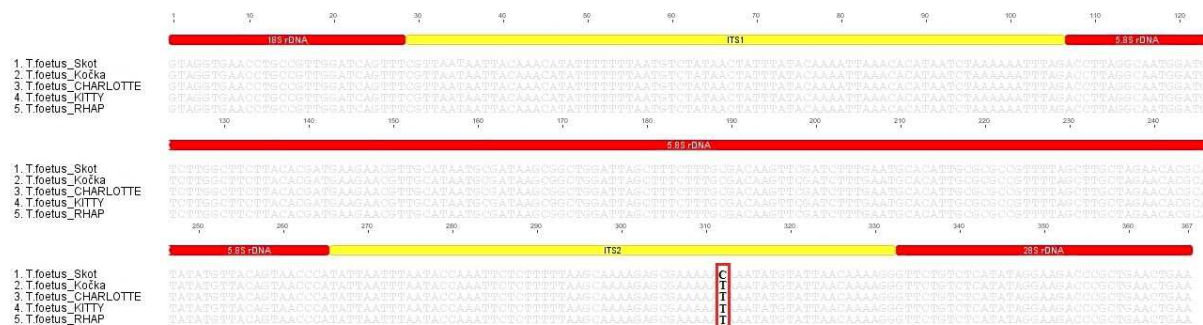


Obrázek 21: Příklad výsledku identifikace *P. hominis* tandemovou PCR. Elektroforéza vzorků po druhé PCR za použití specifických primerů (PH-F, PH-R) pro amplifikaci DNA *P. hominis* ze vzorků pozitivních na střevní trichomonády. Vzorky č. 1 a 15 jsou pozitivní na *P. hominis*, ostatní vzorky jsou negativní. Negativní kontrola obsahovala vodu místo DNA. Do pozitivní kontroly byla přidána DNA *P. hominis*.



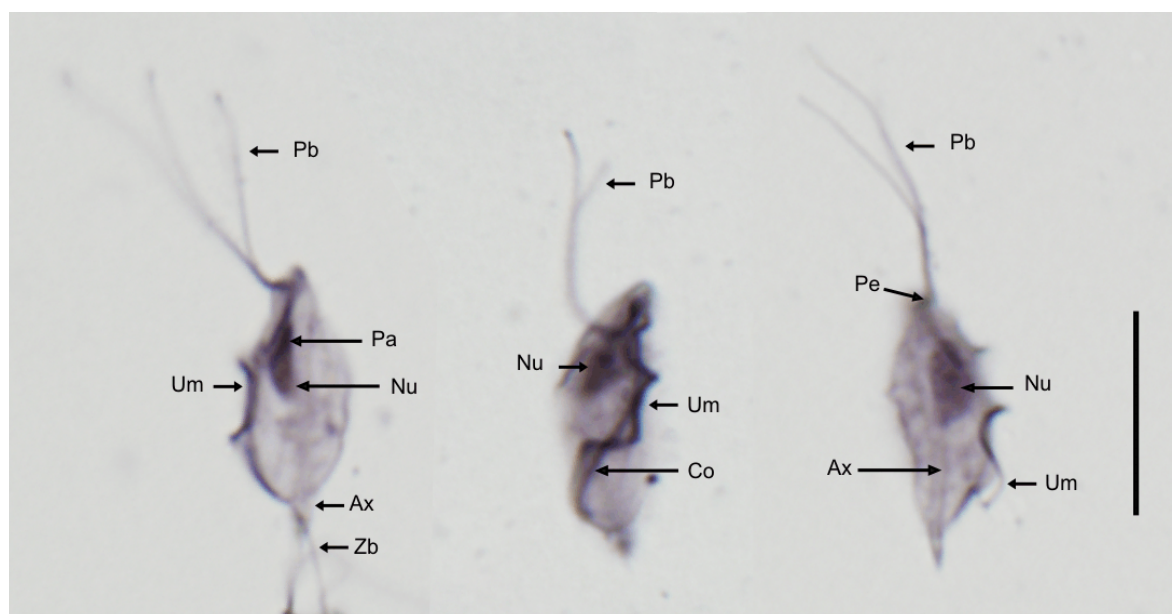
T. foetus byl identifikován pomocí nested PCR u 4 psů a 16 koček (tabulka 25). Sekvence izolátu *T. foetus* vykultivovaného ze tří koček (Charlotte, Kitty, Rhap) byla srovnána (obrázek 22) s izolátem *T. foetus* z kočky z USA (kočičí genotyp) a s izolátem *T. foetus* ze skotu (bovinní genotyp). Na základě tohoto srovnání je vidět, že sekvence izolátů *T. foetus* z koček získaných v České republice jsou identické se sekvencí ITS1-5.8S rRNA-ITS2 *T. foetus* izolovaného z kočky v USA. Rozdíl mezi genotypem kočky a skotu je v pozici 312 úseku genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2, kde došlo u genotypu koček ke konverzi nukleotidu T za C. Sekvence získané z pozitivních vzorků zjištěné pomocí nested PCR nemohly být srovnány se sekvencemi získaných z kultur *T. foetus*, protože vzniklý DNA fragment po nested PCR byl příliš krátký, neobsahoval variabilní úsek ITS2 (viz schéma amplifikace úseku genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2 obecnými primery pro nested PCR na obrázku 9).

Obrázek 22: Porovnání úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2 pěti izolátů *T. foetus*: 1. izolát ze skotu (AF339736), 2. izolát z kočky z USA (AF466750), 3.-5. izoláty z České republiky, kmeny Charlotte, Kitty, Rhap. Kočičí izolát se liší od izolátu skotu v 1 nukleotidu v pozici 312, který je zvýrazněn v červeném obdélníku.



Získaný izolát *T. foetus* z koček byl dále studován světelnou mikroskopií. Z obrázku 23 je patrné, že trichomonády kmene Rhap mají charakteristický štíhlý tvar buňky, z jehož přední části vycházejí tři přední bičíky. Z přední také části odstupuje zpětný bičík, který tvoří dobře vyvinutou undulující membránu. Undulující membrána, která je podepřena kostou, se vine až ke konci buňky, kde je zpětný bičík zakončen volnou částí. Bazální tělíska bičíků jsou kryta peltou, která přechází v axostyl. Axostyl je široce svinutý a prochází celým buněčným tělem s krátkou vystupující částí na konci buňky. Nad jádrem je tyčovitý parabazální aparát. Popis morfologie kmene Rhap, potvrzuje, že se jedná o *T. foetus*.

Obrázek 23: Buňky *T. foetus* kmene Rhap, které byly obarvené protargolem. Ax – axostyl, Co – kosta, Pa – parabazální aparát, Pe – pelta, Pb – přední bičík, Nu – nukleus, Um – undulující membrána, Zb – zpětný bičík. Měřítko je 10 μ m.



P. hominis byl prokázán u 4 koček (tabulka 25) pomocí tandemové PCR. U 2 koček byla zjištěna smíšená infekce *P. hominis* a *T. foetus*. Pomocí specifické PCR se nepodařilo identifikovat 13 vzorků pozitivních na střevní trichomonády.

Tabulka 25: Nalezené trichomonády ve střevech psů a koček

Druhy trichomonád	Psi	Kočky
	Počet	Počet
<i>P. hominis</i>	0	4
<i>T. foetus</i>	4	16
Neurčeno	0	13
Celkem	4	31

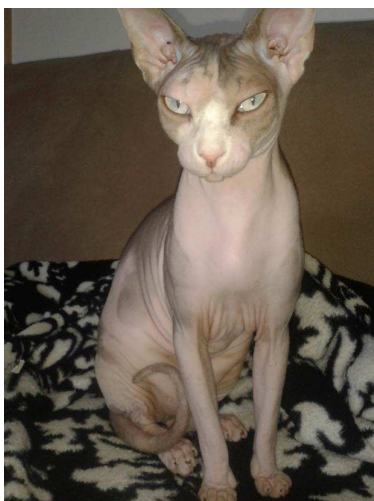
5.2.3. Kazuistiky

T. foetus byl vykultivován ze tří koček:

- 1) Kočka 1 Charlotte, samice, čistokrevné plemeno Sphynx (obrázek 24a), 14 měsíců, trpící průjmy od koupě kotěte – celý rok. Průjmy, obrázek 24b, jsou střídány s řídkou stolicí, jsou mazlavé, s příměsí hlenu a krve. Kočka trpí nadýmáním, neměla nikdy pevnou stolicí. Veterinárním lékařem byl diagnostikován problém zažívacího traktu – špatné trávení lipidů. Po průkazu trichomonád, byla kočka okamžitě léčena Ronidazolem. Po první 14-ti denní kůře se začal trus kočky rýsovat do tvaru. Kočka byla doléčena další 14-ti denní kůrou ronidazolu.
- 2) Kočka 2 Kitty, samice, čistokrevné plemeno Sphynx, stáří 12 měsíců, chována v jedné domácnosti s kočkou 1, ale původně pocházející z jiného chovu. Žádné symptomy nákazy, stolice pevná. Její trus byl pozitivní na přítomnost *T. foetus*. Kočka byla společně s kočkou 1 přeléčena ronidazolem.
- 3) Kočka 3 Rhap, samec, plemene CRX, stáří 10 měsíců, dovezen ze zahraničního chovu. Nikdy nebyla pozorována pevná stolice a někdy se vyskytl i průjem. Nejprve byly u kocoura nalezeny *Giardie sp.*, a po přeléčení metronidazolem byl jeho trus testován na přítomnost *T. foetus*. U kocoura i přes léčbu antiprotozoárním léčivem byl v trusu detekován a následně vykultivován *T. foetus* (obrázek 23). Kocour byl následně přeléčen ronidazolem, opět po dvou 14-ti denních kůrách.

Obrázek 24: Kočka 1, Charlotte – plemeno Sphynx a její trus, konzistence trusu je charakteristická pro kočky nakažené *T. foetus*.

a)



b)



5.3. Prevalence a asociované faktory nákazy

Prevalence orálních a střevních trichomonád u psů a koček v České republice byla stanovena na základě získaných dat z kultivační a molekulární diagnostiky. Z informací získaných z epidemiologických dotazníků byly stanoveny předběžné rizikové faktory a asociované faktory s nákazou orálních trichomonád. Zvýšená nebo snížená šance nákazy byla vypočítána v programu R a udává její veličina OR (odds ratio) na 5 % hladině spolehlivosti (P). Přesnost odhadu rizika nákazy popisuje 95 % interval spolehlivosti intervalu (95 % CI).

5.3.1. Orální trichomonády

Prevalence

Celková prevalence orálních trichomonád

Orální trichomonády bez rozlišení druhu byly celkově diagnostikovány u 57 psů a 26 koček v České republice. Prevalence trichomonád žijících v ústní dutině psů byla 45,2 % (57/126 [95 % CI 0,4-0,5]). Prevalence trichomonád u psů přímo od majitelů činila 50 % (38/76 [95 % CI 0,4-0,6]) a u psů z útulku 38 % (19/50 [95 % CI 0,2-0,5]). Prevalence trichomonád žijících v ústní dutině koček byla 19,3 % (26/135 [95 % CI 0,1-0,2]). Prevalence trichomonád u koček přímo od majitelů činila 27,5 % (19/69 [95 % CI 0,2-0,4]) a u koček z útulku 17,5 % (7/40 [95 % CI 0,1-0,3]). Na základě statistického výpočtu byli psi častěji infikováni orálními trichomonádami než kočky (tabulka 26).

Tabulka 26: Porovnání prevalence orálních trichomonád u koček a psů. OR – odds ratio, P – pravděpodobnost, CI – 95 % interval spolehlivosti.

	Trichomonády pozitivní	Trichomonády negativní	OR	P	95 % CI
Psi (n=126)	57 (45,2 %)	69 (54,8 %)	3,5	< 0,001	1,9-6,0
Kočky (n=135)	26 (19,3 %)	109 (80,7 %)			

Trichomonas sp.

Přítomnost *Trichomonas sp.* byla detekována signifikantně častěji u psů než u koček, 30,6 % versus 6,6 %. Porovnání prevalence u koček a psů je patrné v tabulce 27.

Tabulka 27: Porovnání prevalence *Trichomonas sp.* u psů a koček. OR – odds ratio, *P* – pravděpodobnost, CI – 95 % interval spolehlivosti.

<i>Trichomonas sp.</i>	Pozitivní	Negativní	OR	<i>P</i>	95 % CI
Psi (n=111)	34 (30,6%)	77 (69,4%)	6,3	< 0,0001	2,8-14,3
Kočky (n=122)	8 (6,6%)	114 (93,4%)			

T. tenax

Zastoupení *T. tenax* u psů a koček je 8,1 % a 4,1 %. Na základě statistického výpočtu (tabulka 28) není významný rozdíl v zastoupení *T. tenax* u koček a psů (*P* = 0,21). Vzhledem k nízkému počtu identifikovaných vzorků nelze rozšířenost *T. tenax* mezi kočkami a psy blíže specifikovat.

Tabulka 28: Rozdíl v nákaze *T. tenax* u psů a koček.

<i>Trichomonas tenax</i>	Pozitivní	Negativní	OR	<i>P</i>	95 % CI
Psi (n=111)	9 (8,1%)	102 (91,9%)	2,1	0,21	0,7-6,4
Kočky (n=122)	5 (4,1%)	117 (95,9%)			

Demografické a zdravotní faktory asociované s infekcí trichomonádami

Demografické a zdravotní informace o vyšetřovaných psech a kočkách byly zjišťovány hodnocením epidemiologických dotazníků (příloha 1). Na základě těchto informací byly stanoveny možné rizikové faktory nákazy orálními trichomonádami nebo asociace nákazy s demografickými/zdravotními faktory. Epidemiologická data dále sloužila ke stanovení souvislostí mezi faktory s nákazou *Trichomonas sp.* a *T. tenax*. Ze všech získaných epidemiologických informací byly pro statistickou analýzu vybrány ty faktory, které byly považovány za související: *pohlaví, věk, plemeno, typ chovu, způsob ubytování, zubní potíže, respirační potíže, jiná onemocnění a odčervení*. Pro zjištění nezávislých souvislostí mezi těmito faktory a nákazou trichomonádami, byla provedena logistická regrese v programu R, kdy do prvního modelu byly vždy zařazeny všechny faktory. Tyto modely byly redukovány zpětnou eliminací pomocí funkce stepwise, založené na hodnotě Akaikeova informačního kritéria AIC. Výstupní modely pak poskytovaly adjustované veličiny, na základě kterých byla odhadnuta šance nákazy (OR) v souvislosti se sledovaným faktorem.

Všechny orální trichomonády u psů

Nejprve byla zjišťována souvislost mezi nákazou trichomonádami a jednotlivými faktory aniž by byl brán v úvahu vzájemný vliv mezi samotnými faktory (tabulka 29 sloupec A). Tato analýza naznačila, že *věk*, *ubytování* a *zubní potíže* mohou mít vliv na nákazu trichomonádami. Jedinci mladší tří let byli méně postižení infekcí (28 %) než jedinci starší tří let (60 %) ($P = <0,01$). Psi žijící sami (23 %) byli méně vystaveni infekci trichomonádami než psi žijící ve skupinách po dvou a více (55 %) ($P = <0,01$). Psi se zubními potížemi (73 %) byli častěji nakaženi trichomonádami ($P = <0,01$) než psi bez přítomnosti zubního kamene a bez periodontálních onemocnění (32 %).

Následně bylo přistoupeno k stepwise logistické regresi, kde byly odstraněny bezvýznamné veličiny, a odstraněna vzájemná souvislost mezi faktory. Výstupní model byl vytvořen z 6-ti faktorů (*věk*, *plemeno*, *způsob chovu*, *způsob ubytování*, *zubní potíže* a *odčervení*), jehož hodnoty jsou v tabulce 29 sloupec B. Z tohoto modelu je patrné, že infekce trichomonádami souvisí s mnoha faktory. Z modelu byla tedy odhadnuta pravděpodobnost nákazy a vypočítán interval spolehlivosti. Na základě výpočtu bylo zjištěno, že křížení psi byli 3,8krát více nakaženi než psi čistokrevní ($P = 0,02$). Psi chovaní v útulcích a jedinci chovaní po jednom zvířeti byli 0,3krát nakaženi méně ($P = 0,05$; $P = <0,01$) než psi v domácnosti a psi žijící společně s více jak dvěma psy. Trichomonády se vyskytovaly 4,6krát více u psů se zubními potížemi ($P = <0,01$) a 5,6krát více u psů neodčervěných ($P = 0,05$). Souvislost nákazy trichomonádami s věkem psů nebyla podpořena. Vliv onemocnění na nákazu trichomonádami nebyl významný.

Tabulka 29: Souvislosti mezi demografickými/zdravotními faktory a infekcí orálními trichomonádami u psů. Označená pole upozorňují na statisticky významné asociované faktory s nákazou trichomonádami. Sloupec A – odhad šance onemocnění bez ohledu na vzájemné vlivy mezi testovanými faktory, Sloupec B – výpočet stepwise logistickou regresí - odhad šance onemocnění po odečtení vzájemných vlivů mezi testovanými faktory: * adjustované veličiny, NA = neanalyzováno.

Faktory		Pozitivní na Trichomonády	Negativní na Trichomonády	A			B		
				OR	P	95 % CI	OR*	P*	95 % CI*
Pohlaví	Samec	30 (39,0%)	47 (61,0%)	0,5	0,08	0,3-1,1	NA		
	Samice	27 (55,1%)	22 (44,9%)						
Věk	<3 roky	17 (28,3%)	43 (71,7%)	0,3	<0,01	0,1-0,5	0,5	0,14	0,2-1,3
	>3roky	40 (61,6%)	26 (39,4%)						
Plemeno	Kříženci	31 (49,2%)	32 (50,8%)	1,4	0,37	0,7-2,8	3,8	0,02	1,3-12,2
	Čistokrevní	26 (41,3%)	37 (58,7%)						
Ubytování	>2 jedinci	48 (55,2%)	39 (44,8%)	4,1	<0,01	1,7-9,7	0,3	<0,01	0,1-0,7
	1 jedinec	9 (23,1 %)	30 (76,9%)						
Způsob chovu	Majitel	38 (50,0%)	38 (50,0%)	1,6	0,19	0,8-3,4	0,3	0,05	0,1-0,9
	Útulek	19 (38,0%)	31 (62,0%)						
Zubní potíže	Z. potíže	29 (72,5%)	11 (27,5%)	5,5	<0,01	2,4-12,5	4,6	<0,01	1,6-13,8
	Zdravý	28 (32,6%)	58 (67,4%)						
Respirační potíže	Nemocný	4 (66,7%)	2 (33,3%)	2,5	0,29	0,4-14,3	NA		
	Zdravý	53 (44,2%)	67 (55,8%)						
Onemocnění	Nemocný	9 (40,1%)	13 (59,9%)	0,8	0,70	0,3-2,1	NA		
	Zdravý	48 (46,2%)	56 (53,8%)						
Odčervení	Ano	49 (42,6%)	66 (57,4%)	0,3	0,07	0,1-1,1	5,6	0,05	1,1-35,2
	Ne	8 (72,7%)	3 (27,3%)						

Trichomonas sp. u psů

Trichomonas sp. byl diagnostikován u 34/111 vyšetřovaných psů (30,6 %). Souvislost nákazy *Trichomonas sp.* s demografickými a zdravotními faktory byla zkoumána podobně jako v předchozím případě. V tabulce 30 sloupci A je vidět souvislost nákazy *Trichomonas sp.* s pohlavím ($P = 0,02$), s věkem ($P = <0,01$), ubytováním ($P = 0,04$) a se zubními potížemi ($P = <0,01$). Opět byla stepwise logistickou regresí zjišťována skutečná asociace demografických a zdravotních faktorů s přítomností *Trichomonas sp.* v dutině ústní psů. Model zahrnoval pouze faktory *plemeno*, *typ chovu* a *zubní potíže* (tabulka 30 sloupec B). Na základě získaného modelu bylo zjištěno, že statisticky významná souvislost nákazy *Trichomonas sp.* je u kříženců, u kterých byla nákaza *Trichomonas sp.* až 6krát vyšší než u čistokrevných psů ($P = <0,01$), a u psů žijících v útulku u kterých byla nákazy 0,3krát menší než u psů žijících v domácnosti ($P = 0,02$). Psi se zubními potížemi byli 11,6krát více infikováni *Trichomonas sp.* než psi se zdravou dutinou ústní ($P = <0,01$).

Tabulka 30: Souvislosti mezi demografickými/zdravotními faktory a infekcí *Trichomonas* sp. u psů. Označená pole upozorňují na statisticky významné asociované faktory s nákazou *T. sp.* Sloupec A – odhad šance onemocnění bez ohledu na vzájemné vlivy mezi testovanými faktory, Sloupec B – výpočet stepwise logistickou regresí - odhad šance onemocnění po odečtení vzájemných vlivů mezi testovanými faktory: * adjustované veličiny, NA = neanalyzováno.

Faktory		Pozitivní na <i>T. sp.</i>	Negativní na <i>T. sp.</i>	A			B		
				OR	<i>P</i>	95 % CI	OR*	<i>P</i> *	95 % CI*
Pohlaví	<i>Samec</i>	15 (22,1%)	53 (77,9%)	0,4	0,02	0,2-0,8	NA		
	<i>Samice</i>	19 (44,2%)	24 (55,8%)						
Věk	<i><3 roky</i>	9 (16,7%)	45 (83,3%)	0,3	<0,01	0,1-0,6	NA		
	<i>>3roky</i>	25 (43,9%)	32 (56,1%)						
Plemeno	<i>Kříženci</i>	22 (37,3%)	37 (62,7%)	2,0	0,1	0,9-4,6	6,2	<0,01	1,9-22,8
	<i>Čistokrevní</i>	12 (23,1%)	40 (76,9%)						
Ubytování	<i>>2 jedinci</i>	27 (37,5%)	45 (62,5%)	2,7	0,04	1,1-7,1	NA		
	<i>1 jedinec</i>	7 (17,9 %)	32 (82,1%)						
Způsob chovu	<i>Majitel</i>	21 (32,8%)	43 (67,2%)	1,3	0,6	0,6-2,9	0,2	0,02	0,1-0,8
	<i>Útulek</i>	13 (27,7%)	34 (72,3%)						
Zubní potíže	<i>Z. potíže</i>	21 (61,8%)	13 (38,2%)	8,0	<0,01	3,2-19,8	11,6	<0,01	4,3-35,0
	<i>Zdravý</i>	13 (16,9%)	64 (83,1%)						
Respirační potíže	<i>Nemocný</i>	2 (50%)	2 (50%)	2,3	0,4	0,3-17,4	NA		
	<i>Zdravý</i>	32 (29,9%)	75 (70,1%)						
Onemocnění	<i>Nemocný</i>	5 (26,3%)	14 (73,7%)	0,8	0,65	0,3-2,36	NA		
	<i>Zdravý</i>	29 (31,5%)	63 (68,5%)						
Odčervení	<i>Ano</i>	31 (30,7%)	70 (69,3%)	1,0	0,96	0,3-4,3	NA		
	<i>Ne</i>	3 (30%)	7 (70%)						

Trichomonas tenax u psů

T. tenax byl identifikován u 9/111 psů (8,1 %). Opět byla zjišťována asociace demografických a zdravotních faktorů s přítomností *T. tenax* v dutině ústní psů (tabulka 31). Nicméně žádný z faktorů nevykazoval žádnou procentuální ani statisticky významnou asociaci s nákazou *T. tenax*. Model pro logistickou regresi byl vytvořen ze tří faktorů – *typ chovu*, *způsob ubytování* a *odčervení*. Na základě tohoto modelu bylo zjištěno, že odčervení psi byli vystaveni riziku nákazy *T. tenax* 50krát méně ($P = <0,01$). Interval spolehlivosti je však poměrně široký, což pravděpodobně odpovídá nízkému počtu nakažených psů.

Tabulka 31: Souvislosti mezi demografickými/zdravotními faktory a infekcí *Trichomonas tenax* u psů. Označená pole upozorňují na statisticky významné asociované faktory s nákazou *T. tenax*. Sloupec A – odhad šance onemocnění bez ohledu na vzájemné vlivy mezi testovanými faktory, Sloupec B – výpočet stepwise logistickou regresí - odhad šance onemocnění po odečtení vzájemných vlivů mezi testovanými faktory: * adjustované veličiny, NA = neanalyzováno.

Faktory		Pozitivní na <i>T. tenax</i>	Negativní na <i>T. tenax</i>	A			B		
				OR	<i>P</i>	95 % CI	OR*	<i>P</i> *	95 % CI*
Pohlaví	<i>Samec</i>	6 (8,8%)	62 (91,2%)	1,3	0,73	0,3-5,5	NA		
	<i>Samice</i>	3 (7,0%)	40 (93,0%)						
Věk	<i><3 roky</i>	2 (3,7%)	52 (96,3%)	0,3	0,12	0,1-1,4	NA		
	<i>>3roky</i>	7 (12,3%)	50 (87,7%)						
Plemeno	<i>Kříženci</i>	6 (10,2%)	53 (89,8%)	1,8	0,40	0,4-7,8	NA		
	<i>Čistokrevní</i>	3 (5,8%)	49 (94,2%)						
Ubytování	<i>>2 jedinci</i>	7 (9,7%)	65 (90,3%)	2,0	0,4	0,4-10,1	0,3	0,17	0,0-1,5
	<i>1 jedinec</i>	2 (5,1 %)	37 (94,9%)						
Způsob chovu	<i>Majitel</i>	5 (7,8%)	59 (92,2%)	0,9	0,89	0,2-3,6	5,5	0,14	0,8-109,4
	<i>Útulek</i>	4 (8,5%)	43 (91,5%)						
Zubní potíže	<i>Z. potíže</i>	3 (8,8%)	31 (91,2%)	1,1	0,85	0,3-4,9	NA		
	<i>Zdravý</i>	6 (7,8%)	71 (92,2%)						
Respirační potíže	<i>Nemocný</i>	0 (0,0%)	4 (100,0%)	1,2	0,92	0,1-23,1	NA		
	<i>Zdravý</i>	9 (8,4%)	98 (91,6%)						
Onemocnění	<i>Nemocný</i>	1 (5,3%)	18 (94,7%)	0,6	0,6	0,1-5,0	NA		
	<i>Zdravý</i>	8 (8,7%)	84 (91,3%)						
Odčervení	<i>Ano</i>	5 (5,0%)	96 (95,0%)	0,1	<0,01	0,0-0,4	50,3	<0,01	5,7-1166,4
	<i>Ne</i>	4 (40,0%)	6 (60,0%)						

Všechny orální trichomonády u koček

Orální trichomonády byly zjištěny u 26/135 (19,3 %) vyšetřovaných koček. Nejprve byla zjišťována souvislost mezi nákazou trichomonádami a jednotlivými faktory aniž by byl brán v úvahu vzájemný vliv mezi samotnými faktory (tabulka 32 sloupec A). Z této analýzy vyplývá, že čistokrevné kočky (30,8 %) byly častěji infikovány trichomonádami ($P = 0,03$) než kočky křížené (14,6 %). Následně bylo přistoupeno k stepwise logistické regresi, kde byly odstraněny bezvýznamné veličiny, a odstraněna vzájemná souvislost mezi faktory. Výstupní model byl vytvořen ze 4 faktorů (*věk*, *plemeno*, *respirační potíže* a *odčervení*), jejichž hodnoty jsou uvedeny v tabulce 32 sloupec B. Tento konečný model vyhodnotil všechny faktory v souvislosti s nákazou trichomonádami jako statisticky významné. Křížené kočky a kočky mladší tří let byly 0,3krát méně nakaženy orálními trichomonádami než kočky čistokrevné ($P = 0,02$) a kočky starší tří let ($P = 0,03$). Podobně byly zdravé kočky bez onemocnění 0,3krát méně infikovány než kočky nemocné ($P = 0,05$). S překvapením bylo zjištěno, že kočky bez respiračních potíží byly 7,6krát více nakaženy než kočky trpící respiračními problémy ($P = 0,05$).

Tabulka 32: Souvislosti mezi demografickými/zdravotními faktory a infekcí orálními trichomonádami u koček. Označená pole upozorňují na statisticky významné asociované faktory s nákazou trichomonádami. Sloupec A – odhad šance onemocnění bez ohledu na vzájemné vlivy mezi testovanými faktory, Sloupec B – výpočet stepwise logistickou regresí - odhad šance onemocnění po odečtení vzájemných vlivů mezi testovanými faktory: * adjustované veličiny, NA = neanalyzováno.

Faktory		Pozitivní na Trichomonády	Negativní na Trichomonády	A			B		
				OR	P	95 % CI	OR*	P*	95 % CI*
Pohlaví	Samec	16 (20,5%)	62 (79,5%)	1,2	0,67	0,5-2,9	NA		
	Samice	10 (17,5%)	47 (82,5%)						
Věk	<3 roky	15 (16,0%)	79 (84,0%)	0,5	0,14	0,2-1,3	0,32	0,03	0,1-0,9
	>3roky	11 (26,8%)	30 (73,2%)						
Plemeno	Kříženci	14 (14,6%)	82 (85,4%)	0,4	0,03	0,2-0,9	0,3	0,02	0,1-0,8
	Čistokrevní	12 (30,8%)	27 (69,2%)						
Ubytování	>2 jedinci	23 (22,1%)	81 (77,9%)	2,3	1,50	0,7-9,5	NA		
	1 jedinec	3 (9,7%)	28 (90,3%)						
Způsob chovu	Majitel	19 (21,6%)	69 (78,4%)	1,6	0,35	0,6-4,1	NA		
	Útulek	7 (14,9%)	40 (85,1%)						
Zubní potíže	Z. potíže	6 (30,0%)	14 (70,0%)	2,0	0,19	0,7-5,9	NA		
	Zdravý	20 (17,4%)	95 (82,6%)						
Respirační potíže	Nemocný	3 (12,5%)	21 (87,5%)	0,5	0,36	0,2-2,0	7,6	0,03	1,3-52,0
	Zdravý	23 (20,7%)	88 (79,3%)						
Onemocnění	Nemocný	8 (22,9%)	27 (77,1%)	1,3	0,53	0,5-3,5	0,3	0,05	0,1-0,99
	Zdravý	18 (18,0%)	82 (82,0%)						
Odčervení	Ano	18 (16,8%)	89 (83,2%)	0,5	0,17	0,2-1,3	NA		
	Ne	8 (28,6%)	20 (77,4%)						

Trichomonas sp. u koček

Trichomonas sp. byl diagnostikován u 8/122 vyšetřených koček (6,6 %). Souvislost nákazy *Trichomonas sp.* s demografickými a zdravotními faktory byla zkoumána podobně jako v předchozím případě. V tabulce 33 sloupci A je vidět souvislost nákazy *Trichomonas sp.* s věkem ($P = <0,05$), kdy kočky starší tří let (13,9 %) byly častěji nakaženy než kočky mladší (3,5 %). Dále je v tabulce patrná souvislost s plemenem ($P = 0,05$), kdy kočky čistokrevné (13,9 %) byly více nakaženy než křížené (3,5 %) a také s odčervěním ($P = <0,05$), kdy kočky neodčervené (16 %) byly častěji nakaženy než kočky odčervené (4,1 %). Opět byla logistickou regresí zjišťována skutečná asociace demografických a zdravotních faktorů s přítomností *Trichomonas sp.* v dutině ústní koček. Model zahrnoval faktory věk, způsob chovu, respirační potíže a jiná onemocnění (tabulka 33 sloupec B). Na základě získaného modelu bylo zjištěno, že statisticky významná souvislost nákazy *Trichomonas sp.* je u koček mladších tří let, které byly 0,1krát méně infikovány než kočky starší tří let ($P = <0,01$). Další asociace byla potvrzena pro faktor jiná onemocnění, kde zdravé kočky byly 0,1krát méně nakaženy než kočky nemocné ($P = 0,04$). Asociace nákazy se způsobem chovu a respiračními potížemi nebyla statisticky významná ($P = 0,99$; $P = 0,10$).

Tabulka 33: Souvislosti mezi demografickými/zdravotními faktory a infekcí *Trichomonas* sp. u koček. Označená pole upozorňují na statisticky významné asociované faktory s nákazou *T. sp.* Sloupec A – odhad šance onemocnění bez ohledu na vzájemné vlivy mezi testovanými faktory, Sloupec B – výpočet stepwise logistickou regresí - odhad šance onemocnění po odečtení vzájemných vlivů mezi testovanými faktory: * adjustované veličiny, NA = neanalyzováno.

Faktory		Pozitivní na T. sp.	Negativní na T. sp.	A			B		
				OR	P	95%CI	OR*	P*	95 % CI*
Pohlaví	Samec	5 (7,1%)	65 (92,9%)	1,3	0,76	0,3-5,5	NA		
	Samice	3 (17,3%)	49 (94,2%)						
Věk	<3 roky	3 (3,5%)	83 (96,5%)	0,2	0,05	0,1-0,9	0,1	<0,01	0,0-0,6
	>3roky	5 (13,9%)	31 (86,1%)						
Plemeno	Kříženci	3 (3,5%)	83 (96,5%)	0,2	0,05	0,1-0,9	NA		
	Čistokrevní	5 (13,9%)	31 (86,1%)						
Ubytování	>2 jedinci	7 (7,6%)	85 (92,4%)	2,4	0,42	0,3-20,2	NA		
	1 jedinec	1 (3,0%)	29 (97,0%)						
Způsob chovu	Majitel	8 (9,8%)	74 (90,2%)	9,2	0,13	0,5-164,3	8,4 ⁹	0,99	NA
	Útulek	0 (0,0%)	40 (100,0%)						
Zubní potíže	Z. potíže	1 (6,7%)	14 (93,3%)	1	1	0,1-9	NA		
	Zdravý	7 (6,5%)	100 (93,5%)						
Respirační potíže	Nemocný	7 (7,0%)	93 (93,0%)	0,2	0,3	0,0-3,8	11,3	0,10	0,7-448,9
	Zdravý	1 (4,5%)	21 (95,5%)						
Onemocnění	Nemocný	3 (10,0%)	27 (90,0%)	1,9	0,4	0,4-8,6	0,1	0,04	0,0-1,0
	Zdravý	5 (5,4%)	87 (94,6%)						
Odčervení	Ano	4 (4,1%)	93 (95,9%)	0,2	0,05	0,1-1	NA		
	Ne	4 (16,0%)	21 (84,0%)						

Trichomonas tenax u koček

Trichomonas tenax byl identifikován u 5/122 vyšetřených koček (4,1 %). Souvislost nákazy *T. tenax* s demografickými a zdravotními faktory je vidět v tabulce 34. Čistokrevné kočky (11,1 %) byly častěji nakažené než křížené (1,2 %) a kočky s respiračními potížemi (3 %) byly méně nakaženy než kočky zdravé (18,5 %). Model pro logistickou regresi zahrnoval pouze faktory *plemeno* a *jiná onemocnění* (tabulka 33 sloupec B). Na základě získaného modelu bylo zjištěno, že statisticky významná souvislost nákazy *T. tenax* je s *plemenem*, kde křížené kočky byly 8krát méně nakaženy než kočky čistokrevné ($P = 0,03$). Vzhledem k nízkému počtu vzorků nakažených koček, nebylo možné vytvořit model logistické regrese pro stanovení významnosti dalších faktorů.

Tabulka 34: Souvislosti mezi demografickými/zdravotními faktory a infekcí *Trichomonas tenax* u koček. Označená pole upozorňují na statisticky významné asociované faktory s nákazou *T. tenax*. Sloupec A – odhad šance onemocnění bez ohledu na vzájemné vlivy mezi testovanými faktory, Sloupec B – výpočet stepwise logistickou regresí - odhad šance onemocnění po odečtení vzájemných vlivů mezi testovanými faktory: * adjustované veličiny, NA = neanalyzováno.

Faktory		Pozitivní na <i>T. tenax</i>	Negativní na <i>T. tenax</i>	A			B		
				OR	<i>P</i>	95%CI	OR*	<i>P</i> *	95%CI*
Pohlaví	<i>Samec</i>	3 (4,3%)	67 (95,7%)	1,1	0,9	0,2-7	NA		
	<i>Samice</i>	2 (3,8%)	50 (96,2%)						
Věk	<i><3 roky</i>	4 (4,7%)	82 (95,3%)	1,7	0,64	0,2-15,8	NA		
	<i>>3roky</i>	1 (2,8%)	35 (97,2%)						
Plemeno	<i>Kříženci</i>	1 (1,2%)	85 (98,8%)	0,1	0,04	0,0-0,9	0,08	0,03	0,0-0,5
	<i>Čistokrevní</i>	4 (11,1%)	32 (88,9%)						
Ubytování	<i>>2 jedinci</i>	4 (4,3%)	88 (95,7%)	1,3	0,8	0,1-12,3	NA		
	<i>1 jedinec</i>	1 (3,3%)	29 (96,7%)						
Způsob chovu	<i>Majitel</i>	5 (6,1%)	77 (93,9%)	5,7	0,24	0,3-106,6	NA		
	<i>Útulek</i>	0 (0,0%)	40 (100,0%)						
Zubní potíže	<i>Z. potíže</i>	0 (0,0%)	15 (100,0%)	0,6	0,73	0,0-11,4	NA		
	<i>Zdravý</i>	5 (4,7%)	102 (95,3%)						
Respirační potíže	<i>Nemocný</i>	0 (0,0%)	22 (100,0%)	0,1	0,01	0,0-0,6	NA		
	<i>Zdravý</i>	5 (5,0%)	95 (95,0%)						
Onemocnění	<i>Nemocný</i>	0 (0,0%)	30 (100,0%)	1,9	0,39	0,4-8,6	5,8 ⁺⁰⁷	0,99	NA
	<i>Zdravý</i>	5 (5,4%)	87 (94,6%)						
Odčervení	<i>Ano</i>	4 (4,1%)	93 (95,9%)	1	0,98	0,1-9,7	NA		
	<i>Ne</i>	1 (4,0%)	24 (96,0%)						

Statistickou analýzou byly odhadnuty šance nákazy trichomonádami u jedinců exponovaných nějakému faktoru a byly zjištěny souvislosti mezi demografickými faktory, zdravotními faktory a nákazou orálními trichomonádami. U všech infekcí trichomonádami (orální trichomonády, *T. sp.*, *T. tenax*) u psů byl nápadný trend nižší nákazy trichomonádami u psů mladších tří let a vyšší infekce trichomonádami u kříženců, u psů chovaných ve skupinách (po >2 jedincích), u psů se zubními potížemi a u psů odčervencých. Všechny tyto trendy, mimo věk, byly statisticky významné pro nákazu orálními trichomonádami. Statisticky významná hodnota pro nákazu orálními trichomonádami a *T. sp.* byla u faktoru *typ chovu*, kde jedinci žijící v útulcích mají nižší šanci se nakazit než psi žijící v domácnosti.

U všech infekcí trichomonádami (orální trichomonády, *T. sp.*, *T. tenax*) u koček byl nápadný trend nižší nákazy u čistokrevných koček. U infekcí *T. sp.* byl navíc pozorován trend nižší nákazy mladších koček. Na základě stepwise logistické regrese byla zjištěna statisticky významně nižší nákaza orálními trichomonádami a nákazou *T. sp.* u koček mladších tří let a koček zdravých bez jiných onemocnění. Podle výsledků mají křížené kočky menší šanci se nakazit orálními trichomonádami a *T. tenax* než kočky čistokrevné. Vzhledem k nízkému počtu pozitivních koček na *T. tenax* a *T. sp.* nebylo možné specifikovat další možné rizikové faktory spojené s infekcí orálními trichomonádami.

5.3.2. *Tritrichomonas foetus*

Prevalence

Prevalence *T. foetus* u vyšetřených koček byla 21,9 % (16/73 [95 % CI 0,1-0,3]). Prevalence tritrichomonád u koček přímo od majitelů činila 23,5 % (12/51) [95 % CI 0,1-0,3]) a u koček z útulku 18,2 % (4/22) [95 % CI 0,1-0,4]). Prevalence *T. foetus* u psů nelze stanovit vzhledem k nízkému počtu vyšetřených psů. *T. foetus* byl nalezen u 4 z 11 psů.

Faktory asociované s infekcí *T. foetus* u koček

Demografické a zdravotní informace o vyšetřovaných kočkách byly zjišťovány pomocí epidemiologických dotazníků (příloha 2). Na základě epidemiologických dat byly stanoveny rizikové faktory s přítomností *T. foetus* u koček. Tyto rizikové faktory jsme porovnávali s epidemiologickými daty o tomto parazitu z jiných studií. Ze všech získaných informací byly pro statistickou analýzu vybrány ty faktory, které byly považovány za související: *pohlaví*, *věk*, *plemeno*, *typ chovu*, *způsob ubytování*, *průjmy*, *jiná onemocnění*, *odčervení* a *lčba antibiotiky*.

Nejprve byla zjišťována souvislost mezi nákazou *Tritrichomonas foetus* a jednotlivými faktory aniž by byl brán v úvahu vzájemný vliv mezi samotnými faktory (tabulka 35 sloupec A). V této části statistické analýzy nebyl žádný faktor statisticky významný v souvislosti s nákazou *T. foetus*. Následně bylo přistoupeno k stepwise logistické regresi, kde byly odstraněny bezvýznamné veličiny, a odstraněna vzájemná souvislost mezi faktory. Výstupní model byl vytvořen ze dvou faktorů (*plemeno* a *antibiotická terapie*), jehož hodnoty jsou v tabulce 35 sloupec B. Na základě takového modelu vyplynulo, že křížené kočky byly 0,4krát méně vystaveny infekci *T. foetus* než kočky čistokrevné a že kočky neléčené antibiotiky byly nakaženy častěji. Nicméně ani jeden z faktorů nedosahuje statistické významnosti ($P = 0,11$, $P = 0,99$), protože zkoumaný počet vzorků je příliš nízký.

Na infekci *T. foetus* neměla vliv jiná onemocnění (23 %, $P = 0,93$). Nebyly nalezeny žádné souvislosti u koček odčervěných (23 %, $P = 0,92$), ani u koček léčených antibiotiky (0 %, $P = 0,99$). Žádný z faktorů signifikantně nezvyšoval ani nesnižoval riziko nákazy *T. foetus*, což může být zkresleno nízkým počtem vyšetřovaných vzorků. Kočky trpící průjmem (22 %) nebyly častěji nakaženy než kočky bez průjmu (22 %, $P = 0,94$). Průjem způsobený nákazou *T. foetus* nebyl častěji u mladých koček než u koček starších jednoho roku, jak bylo předpokládáno. Pouze 20 % pozitivních koček mladší jednoho roku měly průjmové onemocnění (1/5), kočky starší jednoho roku trpěly průjmy více (6/11, 54 %).

Tabulka 35: Souvislosti mezi demografickými/zdravotními faktory a infekcí *Tritrichomonas foetus* u koček. Sloupec A – odhad šance onemocnění bez ohledu na vzájemné vlivy mezi testovanými faktory, Sloupec B – výpočet stepwise logistickou regresí - odhad šance onemocnění po odečtení vzájemných vlivů mezi testovanými faktory: * adjustované veličiny, NA = neanalyzováno.

Faktory		Pozitivní na <i>T. foetus</i>	Negativní na <i>T. foetus</i>	A			B		
				OR	P	95%CI	OR*	P*	95 % CI*
Pohlaví	Samec	9 (27,3%)	24 (72,7%)	2,1	0,23	0,6-7,1	NA		
	Samice	5 (15,2%)	28 (84,8%)						
Věk	<1 roky	5 (17,2%)	24 (82,8%)	0,6	0,44	0,2-2,0	NA		
	>1roky	11 (25%)	33 (75%)						
Plemeno	Kříženci	7 (14,9%)	40 (85,1%)	0,3	0,06	0,1-1,0	0,4	0,11	0,1-1,0
	Čistokrevní	9 (34,6%)	17 (65,4%)						
Ubytování	>2 jedinci	13 (25,0%)	39 (75%)	2,0	0,32	0,5-7,9	NA		
	1 jedinec	3 (14,3%)	18 (85,7%)						
Způsob chovu	Majitel	12 (23,5%)	39 (76,5%)	1,7	0,41	0,5-5,9	NA		
	Útulek	4 (18,2%)	22 (81,8%)						
Průjem	ano	7 (21,9%)	25 (78,1%)	1,0	0,99	0,3-3,0	NA		
	ne	9 (22,0%)	32 (78,0%)						
Onemocnění	Nemocný	3 (23,1%)	10 (76,9%)	1,1	0,91	0,3-4,5	NA		
	Zdravý	13 (21,7%)	47 (78,3%)						
Odčervení	Ano	14 (23,3%)	46 (76,7%)	1,7	0,53	0,3-8,5	NA		
	Ne	2 (15,4%)	11 (84,6%)						
Léčba antibiotiky	Ano	0 (0,0%)	9 (100,0%)	0,2	0,20	0,0-2,8	2,9 ⁺⁰⁷	0,99	NA
	Ne	16 (25,0%)	48 (75,0%)						

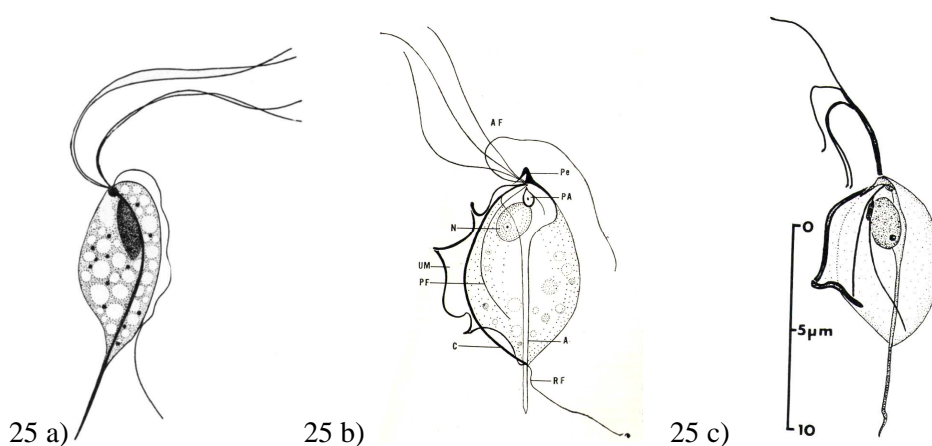
6. DISKUZE

Cílem práce bylo prostudovat výskyt trichomonád u psů a koček v dutině ústní a dále zjistit zda patogenní trichomonády *Trichomonas foetus* se podílejí na průjemovém onemocnění u psů a koček v České republice. Celkem bylo vyšetřeno 126 psů a 135 koček na přítomnost orálních trichomonád a 11 psů a 86 koček na trichomonády zažívacího traktu. Orální trichomonády byly diagnostikovány u 45,2 % psů a 19,3 % koček. Tyto trichomonády zahrnovaly dva druhy: *Trichomonas tenax* a *Trichomonas sp.*, přičemž se u psů a koček častěji vyskytoval *Trichomonas sp.* (79,1 % a 61,5 %) než *T. tenax* (20,9 % a 38,5 %). Přítomnost *T. foetus* v zažívacím traktu byla prokázána u 16 koček (21,9 %) a u 4 psů (36,4 %). Rovněž byl u 4 koček diagnostikován *Pentatrichomonas hominis*. U nakažených zvířat byla hledána asociace přítomnosti trichomonád s demografickými a zdravotními faktory. Souvislost nákazy orálními trichomonádami byla u psů prokázána s plemenem, ubytováním, způsobem chovu, se zubními potížemi a s odčervěním. U koček byla prokázána souvislost s věkem, plemenem, respiračními potížemi a jiným onemocněním. U infekce *T. foetus* nebyla, vzhledem k nízkému počtu vzorků, nalezena souvislost s demografickými nebo zdravotními faktory. Nicméně přítomnost *T. foetus* u 7 koček a 4 psů s průjmy nevylučuje možnost, že *T. foetus* by se mohl podílet na onemocnění těchto hostitelů.

Detekce a identifikace orálních trichomonád

Naše výsledky ukázaly, že v ústní dutině psů a koček žijí dva druhy trichomonád rodu *Trichomonas*: *T. tenax* a patrně nový doposud nepopsaný druh *Trichomonas sp.* V ústní dutině psů byl dosud popsán pouze druh *Trichomonas canistomae* (Hegner & Ratcliffe 1927a) a v ústní dutině koček *Trichomonas felistomae* (Hegner & Ratcliffe 1927b). Na základě morfologických znaků (obrázek 25 a) byly tyto druhy později přeřazeny do rodu *Tetratrichomonas* a přejmenovány na *Tetratrichomonas canistomae* a *Tetratrichomonas felistomae* (Levine 1973; BonDurant & Honigberg 1994). V literatuře je však *Tetratrichomonas canistomae* někdy označován starým názvem *Trichomonas canistomae* (Stockdale *et al.* 2006), což způsobuje nejasnosti. Obrázek původního popisu *Tetratrichomonas canistomae* a morfologické rozdíly rodů *Trichomonas* a *Tetratrichomonas* jsou zachyceny na obrázku 25. Nejvýraznějším morfologickým znakem je volné zakončení zpětného bičíku u rodu *Tetratrichomonas*, kdežto rod *Trichomonas* má undulující membránu zakončenou ve 2/3 buněčného těla a undulující membrána nepokračuje volnou částí bičíku (obrázek 25 b, c) (Brugerolle 1976; Honigberg 1963).

Obrázek 25: Morfologické znaky druhu (a) *Tetratrichomonas canistomae* (Hegner & Ratcliffe 1927a; BonDurant & Honigberg 1994) barveného hematoxylinem a srovnání rodu *Tetratrichomonas* a *Trichomonas* na družích (b) *Tetratrichomonas gallinarum* (převzato z Kulda *et al.* 1974) a (c) *Trichomonas tenax* (Honigberg & LEE 1959). Na obrázku (a) jsou vidět 4 přední bičíky stejné délky, zpětný bičík tvoří undulující membránu a pokračuje volnou částí na konci buněčného těla. Na obrázku (b) jsou zachyceny 4 přední bičíky (AF), zpětný bičík (RF) tvoří undulující membránu (UM) a pokračuje volnou částí na konci buněčného těla, kosta (C), pelta (Pe), axostyl (A), parabazální aparát tvaru diskovitého (PA) a jádro (N). Na obrázku (c) jsou zřetelné 4 přední bičíky, zpětný bičík tvořící undulující membránu zakončenou ve 2/3 buněčného těla a nepokračující volnou částí, a tyčovitý parabazální aparát.



Oba typy orálních trichomonád psů a koček zjištěné v této studii jednoznačně odpovídají rodu *Trichomonas*: čtyři přední bičíky, 1 zpětný bičík, který tvoří undulující membránu do 2/3 těla buňky a nepokračuje volnou částí, tenký dlouhý axostyl a tyčovitý parabazální aparát. Morfologicky však nelze *T. tenax* a *Trichomonas* sp. rozlišit. Příslušnost obou typů trichomonád k rodu *Trichomonas* potvrdila také sekvence genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2. Sekvence a fylogenetická analýza zároveň umožnila rozlišení těchto dvou typů trichomonád a ukázala, že se patrně jedná o dva samostatné druhy. Získané kmeny trichomonád označované jako *Trichomonas* sp. jsou identické s izolátem BRIXI (AY244652) (Kutišová *et al.* 2005) a izolátem *Trichomonas* sp. (AJ784785) nalezeného v dutině ústní psa *T. tenax* a *Trichomonas* sp. se liší v 23 pozicích úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2, přičemž porovnáním těchto sekvencí byla zjištěna podobnost těchto izolátů v 94 %. Druhým nejbližším druhem *Trichomonas* sp., se kterým se shoduje v 94 % nukleotidů, je *Trichomonas equibuccalis*, popsáný z dutiny ústní u koní (Simitch 1938). Vnitřní nepřepisující regiony ITS1 a ITS2 jsou méně konzervovány mezi druhy než rRNA geny a proto jsou vhodné pro charakterizaci fylogeneticky blízké příbuzných organismů, včetně druhů stejného rodu (Hillis & Dixon 1991). Například druh *Tritrichomonas mobilensis* (U86612) se shoduje v 99 % s *Tritrichomonas foetus* (AF466749.1) v úseku genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2 (Šlapeta *et al.* 2010). Druh *Trichomonas tenax* (U86615.1) a *Trichomonas gallinae* kmen G7 (AY349182) jsou

identičtí v 94 % stejně jako *T. tenax* a náš izolát *Trichomonas* sp. Nový druh *Tetratrichomonas empyemagenae* byl navrhnut na základě 99 % identity úseku genu ITS1-5.8S rRNA-ITS2 s *Tetratrichomonas gallinarum* a dalšími druhy rodu *Tetratrichomonas*. Lze proto předpokládat, že *Trichomonas* sp. rovněž reprezentuje nový druh rodu *Trichomonas*. Navrhujeme pro tento nový druh jméno *Trichomonas bixi*. Pro další potvrzení totožnosti izolátů by měla být provedena sekvenční analýza genu 18S rRNA. Podle Stoeck *et al.* (2003) 95 až 99 % podobnost 18S rRNA genu s referenčními kmeny označuje příbuznost do druhu nebo rodu (Stoeck & Epstein 2003).

Na základě našich dat se domníváme, že *T. tenax* a *T. bixi* se vyskytují v ústní dutině jak u koček, tak i u psů. Obdobně Levine (1973) naznačil, že druhy *Tet. canistomae* a *Tet. felistomae* jsou identické (Levine 1973; BonDurant & Honigberg 1994). Nicméně jsme pozorovali rozdíl v kultivaci orálních trichomonád psů a kultivaci orálních trichomonád koček. Kmeny *T. bixi* izolované ze psů rostly dobře na kultivačním mediu podle Wenricha a 4 – 5. den dosáhly maximálního nárůstu. Kmeny z koček rostly výrazně pomaleji a bylo vhodné kombinovat jejich kultivaci na mediu podle Wenricha s médiem TYSGM. Bylo by však potřeba potvrdit toto pozorování přesnými růstovými pokusy a rovněž podrobit tyto kmeny molekulární multilokusové analýze (např. RAPD analýze), která by mohla ukázat, zda existuje rozdílnost v izolátech mezi psy a kočkami.

Je překvapující, že jsme v pátrání po orálních trichomonádách nenašli žádný izolát odpovídající rodu *Tetratrichomonas*. V databázi NCBI jsme však našli sekvenci *Trichomonas canistomae* (AJ784786), který byl izolován z dutiny ústní psa v Polsku. Naše fylogenetická analýza ukázala, že tento izolát spadá do skupiny tetratrichomonád a je tedy pravděpodobné, že se jedná o druh *Tetratrichomonas canistomae* popsáný z roku 1927 Hegnerem & Ratcliffem. Na otázku proč jsme tento druh nezaznamenali u psů v České republice, nedovedeme s přesností odpovědět. Nicméně by to mohlo být z důvodu nižší prevalence *Tet. canistomae* u psů. I přesto, že Hegner a Ratcliff popsali *Tet. canistomae* u 22 psů, které vyšetřovali, ti psi byli chováni v jedné laboratoři a při styku se mohli mezi sebou nakazit od jednoho jediného infikovaného psa. Rousset *et al.* (1970) popisuje, že našel 15 psů infikovaných *Trichomonas canistomae* (v té době ještě nepřejmenovaný druh na *Tetratrichomonas canistomae*), avšak uvádí, že podle mikroskopie a fragmentárních experimentů nemohl zcela rozlišit tento druh od dalších druhů jako je *T. felistomae* a *T. tenax* (Rousset *et al.* 1970). Nelze vyloučit, že se jednalo i o námi popsáný nový druh *T. bixi*.

Trichomonas tenax je známý druh trichomonád z ústní dutiny člověka. Většinou je považován za komenzála, výjimečně však může způsobit plicní trichomoniázu (Hersh 1985). *T. tenax* byl nalezen u 19 ze 111 pacientů s chronickou pneumonií (Tumka, 1956 v Kutišová *et al.* 2005), v průduškách u 37 z 370 pacientů postižených chronickými pneumoniemi a bronchitidami (Kazakova *et al.*, 1980 v Kutišová *et al.* 2005) a u 16 z 30 případů různých plicních onemocnění (Sardis *et al.*, 1983 v Kutišová *et al.* 2005). *T. tenax* byl rovněž nalezen u pacienta v pooperačním období s těžkým zánětem pohrudnice (Leterrier *et al.* 2012). Na Filipínách 14 pacientů ze 44, kteří trpěli respiračními

onemocněními, bylo pozitivních na *T. tenax* (Dimasuay & Rivera 2014). Wenrich (1947) popsal úspěšnou experimentální infekci dutiny ústní psů a koťat lidským izolátem *T. tenax*. V roce 2000 Cielecka et al. (2000) analyzovali izoláty z ústní dutiny člověka, psů a koček pomocí restrikční analýzy úseku ITS1-5.8S rRNA-ITS2. Tato analýza ukázala shodné DNA fragmenty pro všechny orální izoláty. Je však pravděpodobné že tato metoda není dostatečně citlivá pro rozlišení *T. tenax* a *T. brixii*. V naší studii jsme výskyt *T. tenax* u psů a koček jednoznačně prokázali sekvenováním oblasti ITS1-5.8S rRNA-ITS2.

Naše výsledky naznačují zoonotický přenos *T. tenax* mezi člověkem a zvířaty. Přenos *T. tenax* z člověka na člověka je zprostředkován slinami (například kapénkami nebo líbáním), nebo požíváním kontaminovaných pokrmů a pitné vody. Ve vodě je *T. tenax* schopný přežít až 64 hodin (Hersh 1985; Honigberg 1990). Způsob přenosu mezi lidmi a zvířaty by mohl být podobný. Psi a kočky by se mohli nakazit požitím kontaminované potravy a vody, kterou dostanou od svého majitele. Někteří majitelé dávají psům vylizovat nedojedené kelímky od jogurtů, zbytky jídel aj. Naopak lidé by se mohli snadno nakazit od psů a koček v případě, pokud žijí se svým psem/kočkou ve velmi těsném kontaktu: sdílí společně stravu, nechávají se od nich olizovat atp. Obdobně jako v případě *T. brixii* by byla potřebná detailnější molekulární analýza izolátů *T. tenax* získaných od člověka, psů a koček, abychom zjistili, zda tyto kmeny jsou zcela identické, nebo zda je možné rozlišit např. hostitelsky specifické genotypy.

Je známo, že některé tetratrichomonády mohou nakazit širokou škálu nepříbuzných hostitelů, jako například *Tetratrichomonas gallinarum*, který byl nalezen u ptáků a lidí (Čepicka et al. 2005; Kutíšová et al. 2005). Izoláty *Tetratrichomonas* sp. z bronchů a z dutiny ústní u lidí v Estonsku byly 100 % a 95 % identické se třemi kmeny *Tet. gallinarum* izolovaných z hrabavých a vodních ptáků. Ačkoliv testováním infekčnosti izolátů *Tet. gallinarum* z člověka na krůtách neprokázalo přenos lidských izolátů na ptáky, nelze zoonotický původ lidských tetratrichomonád vyloučit (Kutíšová et al. 2005). Navíc je pozoruhodné, že v roce 2000 byl nalezen *Tetratrichomonas canistomae* překvapivě v dutině ústní člověka. Jednalo se o 72 letého pacienta ve Varšavě, léčeného na revmatoidní artritidu (Grytner-Ziecina et al. 2000). Nabízí se tedy otázka, zda by se mohl *T. brixii* vyskytovat rovněž u člověka. Vzhledem k úzkému kontaktu mezi člověkem a psem/kočkou by k přenosu *T. brixii* mezi těmito hostiteli patrně mohlo docházet jako v případě *T. tenax*.

Detekce a identifikace střevních trichomonád

Během naší práce se nám podařilo identifikovat *Tritrichomonas foetus* u 16 koček a 4 psů pomocí nested PCR za použití specifických primerů. Molekulární diagnostika *T. foetus* u psů a koček byla založena na nested PCR podle Gookin 2002, která byla optimalizována v našich podmínkách. Pro transport a uchovávání vzorků se nejvíce osvědčil odběr do etanolu. Vzorky byly co nejdříve uloženy v lednici. Jelikož nested PCR pro detekci *T. foetus* byla vysoce citlivá, byla často ve vzorcích

identifikována *Trichomonas vaginalis* jako kontaminant z prostředí laboratoře, kde se často s DNA *T. vaginalis* pracuje. Proto bylo nutné provádět izolaci DNA a přípravu PCR reakce v přísně oddělených prostorách od vlastní amplifikace vzorků a analýzy elektroforézou.

Nested PCR metodou byly diagnostikovány střevní trichomonády u 31 koček a 4 psů. Čtyři pozitivní vzorky z koček a jedna ze psa byly identifikovány do druhu pomocí sekvenace. Pro identifikaci zbylých pozitivních vzorků byly navrženy specifické primery pro odlišení DNA dvou střevních trichomonád: *Tritrachomonas foetus* a *Pentatrachomonas hominis*. Tímto způsobem bylo následně identifikováno do druhu trichomonády ze 17 pozitivních vzorků. Bohužel se nepodařilo identifikovat 13 vzorků pravděpodobně proto, že reakce specifickými primery nebyly optimalizovány pro vyšší citlivost a nemohlo být tak amplifikováno nízké množství DNA. Dalším důvodem mohl být časový odstup mezi izolací DNA ze vzorku a identifikací specifickými primery, kdy mohlo dojít k degradaci DNA.

Kmeny *Tritrichomonas foetus* byly získány cíleně z 3 koček, které byly pozitivní na *T. foetus* dle výsledků nested PCR. Vzorky pro kultivaci byly odebrány výtěrem hluboko v lumenu střev (15 – 20 cm). Výtěr byl kultivován ve třech zkumavkách s různou koncentrací antibiotik a vzorky byly kontrolovány na přítomnost *T. foetus* čtyři hodiny po odběru. Pozitivní kultury byly okamžitě přeočkovány do čerstvého média s antibiotiky.

Sekvenace a morfologie těchto tří pozitivních koček potvrdila, že jde o druh *T. foetus*. Porovnáním sekvencí izolátů *T. foetus* z koček z České republiky, izolátů z kočky ze Severní Kalifornie v USA (AF466750) a izolátu *T. foetus* ze skotu (AF339736) je vidět, že kočičí izolát z České republiky spadá podle jednonukleotidového rozdílu do stejného genotypu jako izolát z kočky v Kalifornii, tzv. kočičí genotyp. Rozlišení na "kočičí genotyp" a "bovinní genotyp" bylo navrženo na základě jednonukleotidového polymorfismu (T u koček a C u skotu) v oblasti ITS2 a 11 nukleotidových konzervovaných rozdílů ve vysoce variabilním repetitivním DNA elementu amplifikovaném primery TR7/TR8 (Šlapeta *et al.* 2010). Další polymorfické DNA markery odlišující "kočičí genotyp" a "bovinní genotyp" byly zjištěny v nukleotidovém a aminokyselinovém složení cysteinové proteázy 8 (Sun *et al.* 2012) a v rozdílu nukleotidů v semi-konzervovaném úseku elongačního faktoru (EF)- α genu (Reinmann *et al.* 2012). Velmi blízký genetický vztah mezi oběma skupinami poukazuje na velmi podobné biologické vlastnosti. Navíc byla prokázána infekčnost kočičího genotypu u krav, kde *T. foetus* izolovaný z kočky způsobil u experimentálně nakažených krav endometritidy a záněty pochvy (Stockdale *et al.* 2007). Je proto možné, že by mohlo docházet k přenosu *T. foetus* mezi skotem a kočkami i za přirozených podmínek.

Předchozí rutinní kultivační testy 44 koček a 10 psů byly negativní patrně z důvodu nevhodného odběru vzorků. Vzorky trusu pro kultivaci byly odebírány buď výplachem střev, nebo výtěrem střev vatovou tyčinkou. Výtěr střev by se měl provádět dostatečně hluboko (Gookin 2009),

nicméně se při odebrání vzorků nepodařilo u vyšetřovaných koček proniknout výtěrovou tyčinkou do lumenu střeva. Proto vzorky, kultivované v médiu, odebírané paralelně s odebráním trusu do etanolu, představovaly pouze výtěr konečníku. Pravděpodobnost výskytu živých trofozoitů v konečníku je nízká (Gookin 2009). Problém s odběrem vzorků byl dán také tím, že vyšetřované kočky se pevně sevřely a tyčinka musela být zavedena silou, což majitelé obvykle nepovolili. Nicméně ani vzorky odebírané výplachem střev nebyly na tritrichomonády pozitivní. Příčinou toho by mohla být značná kontaminace bakteriemi a nedostatečná koncentrace antibiotik. Kvůli nadměrnému výskytu bakterií v kultuře se nedá vyloučit přehlédnutí tritrichomonád a je pravděpodobné, že masivní nárůst bakterií bránil tritrichomonádám v množení. Příčina přerůstání bakteriemi může být v kultivaci při 37°C, kdežto v manuálu pro In PouchTM systém je doporučeno kultivovat při 25°C (Gookin *et al.* 2003; Hale *et al.* 2009). Nulový záchyt tritrichomonád v médiu mohl být způsoben i tím, že u vzorků odebíraných veterinárním lékařem nebylo možné kontrolovat kultivace bezprostředně v den odběru, kdy zkumavky s médiem nebyly ještě bakteriemi přerostlé. Poslední možnou příčinou negativního výsledku kultivace je dočasná nepřítomnost trofozoitů. Hale *et al.* (2009) popsal, že trofozoiti *T. foetus* jsou vylučovány jen v určitých periodách (Hale *et al.* 2009). Pro tento případ je doporučeno odebrat trus opakovaně nejlépe třikrát po dobu sedmi až deseti dnů, jako je podobně doporučeno pro diagnostiku giardií (Dryden *et al.* 2006; Hale *et al.* 2009). V našem případě nebylo možné tento postup následovat, jelikož zvířata s průjmovým onemocněním dostala u veterináře po odběru trusu okamžitě antibiotickou léčbu. Rovněž nebylo možné odebrat opakovaně trus kočkám z výstav, neboť kočky pocházely z celé republiky a výstavy trvaly pouze tři dny.

Naše výsledky ukazují, že výskyt *Pentatrichomonas hominis* u koček v České republice je 7 % (4/58). Tento nález je mírně vyšší než hlášené nálezy *P. hominis* z jiných zemí, kde byl *P. hominis* zaznamenán od 1 do 2 % (Gookin *et al.* 2007c; Mostegl *et al.* 2012), což by mohlo být zkresleno výběrem vyšetřované populace koček. V našem případě vyšetřované kočky pocházely z širší populace koček než ve studii Gookin *et al.* (2007c), kde kočky byly vyšetřovány pouze na výstavách. Naproti tomu u psů byl *P. hominis* identifikován ve světě častěji. Například v USA byl *P. hominis* zjištěn u 4 ze 104 psů respektive u 18 z 19 psů (Gookin *et al.* 2007a; Tolbert *et al.* 2012), v jižní Koreji u 3 ze 14 (Kim *et al.* 2010), na Filipínských ostrovech ze všech sedmi vyšetřovaných psů (Dimasuy & Rivera 2013). Ve Francii byl *P. hominis* nalezen u 34 z 215 štěňat (Grellet *et al.* 2013). V České republice byl *P. hominis* izolován také v jiné studii u jedné z osmiměsíční kočky trpící průjmy (Cepiecha *et al.* 2013). V naší studii se *P. hominis* u psů nepodařilo identifikovat pravděpodobně z důvodu nízkého počtu vyšetřovaných vzorků.

Prevalence a faktory asociované s infekcí orálních trichomonád

V orální dutině psů byly trichomonády identifikovány častěji než u koček. Příčinou toho zjištění by mohl být buď: (1) rozdíl v sociálním chování psů a koček nebo (2) metodický problém

s poměrně náročným výtěrem ústní dutiny koček. V prvním případě z vlastního pozorování musíme poukázat na specifické chování, které umožňuje snadný přenos orálních mikrobů, kdy např. štěňata a podřazení psi olizují dolní čelist až dutinu ústní starším a nadřazeným psům, dále např. psi, žijící spolu, pijí běžně společně z jedné misky. Naproti tomu kočky si sice vzájemně pečují o srst, avšak neolizují si ústa. Kočky jsou navíc méně společenské a žijí spíše samostatně. Proto si psi mohou předávat ústní trichomonády mezi sebou lépe než kočky. Druhý a neméně významným důvodem zachytu malého množství orálních trichomonád u koček byl fakt, se nám nepodařilo provést výtěr dutiny ústní stejně účinně u psů a u koček. U psů bylo vždy odebráno více materiálu (slin, stěru sliznice) než u koček. Psi mají velkou dutinu ústní a hodně slinní, naproti tomu kočky mají malou dutinu ústní, málo slin a dokáží velmi účinně vzdorovat odběru.

Porovnáním výskytu *Trichomonas tenax* (8,1 %) a *Trichomonas bixi* (30,6 %) u psů je patrné, že *Trichomonas bixi* by mohl být specifickou trichomonádou pro psy, kdežto *T. tenax* se v psi populaci vyskytuje spíše náhodně. U koček, vzhledem k malému počtu pozitivních koček na orální trichomonády (26), nelze rozdíl v zastoupení trichomonád blíže specifikovat (*T. tenax* 4,1 % a *T. bixi* 6,6 %). Zjištěný výskyt *T. tenax* u psů a koček odpovídá prevalenci *T. tenax* v dutině ústní u lidí, která je od 4 % do 53 % (Hersh 1985). Výskyt *T. bixi* nelze porovnat s prevalencí v jiných zemích, nicméně již zmíněný *Tetratrichomonas canistomae* byl nalezen v dutině ústní 22 psů v Baltimoru (Hegner & Ratcliffe 1927a), u jednoho psa v Polsku (Turkiewicz 2004) a dále u 15 psů ze 100 vyšetřených ve Francii (Rousset *et al.* 1970). Z 18 vyšetřovaných koček v Baltimoru byly 2 pozitivní na přítomnost tetratrichomonád popsanych jako *Tet. felistomae*.

Na základě statistických analýz byla nalezena souvislost mezi věkem psů, nákazou orálními trichomonádami (zahrnující oba druhy *T. tenax* a *T. bixi*) a nákazou samotného druhu *T. bixi* u psů a u koček. Kočky starší tří let vykazovaly statisticky významně vyšší nákazu orálními trichomonádami a druhem *T. bixi* než kočky mladší tří let. Podobně v jiných studiích byla zjištěna souvislost nákazy orálními prvky (*T. tenax* a *Entamoeba gingivalis*) s věkem člověka, kdy se ukázalo, že celkově mladí lidé jsou méně nakaženi orálními prvky (Honigberg 1990). U starších psů nebyla častější nákaza orálními trichomonádami statisticky významná, ačkoli byl tento trend nápadný na základě výpočtu OR před adjustací (28,3 % versus 61,6 %). Souvislost nákazy *T. tenax* u psů a u koček s věkem nebylo možné prokázat vzhledem k nízkému počtu nakažených jedinců. Nicméně se však domníváme, že objevená souvislost nákazy trichomonádou s věkem psů může být zapříčiněna častějšími střety starších jedinců s infikovanými psy. Nákazu u mladých psů lze vysvětlit tak, že štěňata se nakazí od matky při vzájemném olizování.

Křížení psi byli statisticky významně častěji infikováni trichomonádami než čistokrevní psi (3,8krát u orálních trichomonád, až 6krát u *T. bixi*). U koček vyšla opačná tendence, tj. křížené kočky jsou méně nakaženy než čistokrevné a to 0,3krát méně orálními trichomonádami bez rozlišení druhu a 0,1krát u *T. bixi*. Pro zjištění souvislosti čistokrevnosti jedince s nákazou *T. tenax* nebylo dostatečné

množství dat. Rozdíl v nákaze čistokrevných a křížených jedinců mezi kočkami a psy by se dal připsat možnosti přenosu trichomonád mezi jedinci žijícími společně. Čistokrevné kočky jsou často chovány ve velkých chovech od útlého věku, kdy si kočky vytvoří mezi sebou úzký vztah (všechny jedí najednou z jedné misky, spí spolu) a tak by mezi nimi mohlo dojít k častějšímu přenosu. Kočky křížené jsou chovány ve velkém množství pravděpodobně pouze v útulcích, kde jsou ale kočky až od staršího věku, a proto nemají tendenci se s ostatními kočkami sbližovat. Většina křížených koček žijících mimo útulky se chová spíše samotářsky. V naší studii jsme v jednom útulku odebrali ze šesti skupin koček 24 vzorků (každá skupina čítala 20 koček). Z toho byly pozitivní na orální trichomonády pouze čtyři kočky ze tří různých skupin. Naproti tomu u psů v útulku, kde žilo 10 psů pohromadě, jsme vyšetřili 8 jedinců a všichni byli pozitivní. Další roli v nákaze orálními trichomonádami může mít imunitní systém. V posledních letech bylo totiž prokázáno, že čistokrevné kočky jsou více náchylné na různé infekce než kříženci (Gookin *et al.* 2004; Stockdale *et al.* 2009).

Přenos *T. tenax* je zprostředkován, jak bylo popsáno výše, kapénkovou infekcí. Domnívali jsme se tedy, že orální trichomonády u psů a koček by se mohly přenášet podobnou cestou s tím, že tento přenos je pravděpodobný u psů a koček, které žijí společně s více jak dvěma psy/kočkami. Pouze u psů nakažených orálními trichomonádami se nám podařilo prokázat statisticky významná souvislost nákazy se způsobem ubytování. Jedinci žijící po jednom jsou statisticky významně méně nakaženi orálními trichomonádami než psi žijící po více jak dvou psech.

V některých studiích bylo prezentováno, že nákaza orálními prvoky stoupá s věkem a s kondicí orální dutiny. Také bylo zjištěno, že bezzubé děti a děti bez periodontálních onemocnění a gingivitid nebyly osídleny *T. tenax*. U lidí bylo zjištěno, že se *T. tenax* vyskytuje nejvíce mezi 40 – 50 lety života a u dětí a starých lidí bez zubů se vyskytuje méně nebo vůbec (Honigberg 1990; Hersh 1985; Šegović *et al.* 1993). Proto jsme se v našem studiu rovněž zabývali souvislostí přítomnosti trichomonád se zdravotním stavem dutiny ústní. Zjistili jsme, že statisticky významná nákaza trichomonád souvisí se zdravotním stavem zubů u psů. U psů se zubními potížemi byl prokázán až 4,6krát statisticky významně vyšší výskyt orálních trichomonád a až 11krát vyšší výskyt *Trichomonas brixii* než u psů se zdravou ústní dutinou. Na přítomnost *T. tenax* má i vliv ústní hygiena, což je ale u psů a koček méně používaná záležitost. Existuje jen málo chovatelů a majitelů psů a koček, kteří čistí zuby svým svěřencům, to byl důvod, proč jsme tento faktor netestovali.

Jelikož kočky často trpí respiračními potížemi, lze předpokládat, že by se trichomonády mohly častěji vyskytovat u zvířat s respiračními potížemi. Tento předpoklad se však nepotvrdil. U koček jsme zjistili kupodivu opačný efekt. Respirační potíže tedy nemají podle našich výsledků přímou souvislost s nákazou orálními trichomonádami. U psů nebyl tento faktor významný, neboť bylo příliš málo zkoumaných jedinců s tímto typem onemocnění.

Dále jsme předpokládali, že přítomnost trichomonád v dutině ústní by mohla souviset se zdravotním stavem jedince. Zkoumali jsme tento jev na faktoru „Onemocnění“. U psů tento faktor neměl žádný význam, pravděpodobně opět z důvodu nízkého počtu jedinců v této skupině. U koček jsme však souvislost našli. Zdravý jedinci byli nakaženi orálními trichomonádami 0,3krát statisticky významně méně a *Trichomonas bixi* 0,1krát méně než nemocní jedinci.

Nepředpokládali jsme žádný vliv odčervení na orální trichomonády, neboť do běžných odčervovacích přípravků nejsou zařazeny žádné léčebné sloučeniny proti prvokům. Nicméně z analýzy dat vyplývá, že neodčervení psi jsou 5,6krát více nakaženi orálními trichomonádami a to především *T. tenax*, který se vyskytuje u neodčervěných psů až 50krát více než u odčervěných. Tento rozdíl však může zkreslovat nízký počet nakažených psů *T. tenax* (9). U koček souvislost odčervení s přítomností trichomonád v dutině ústní nebyla statisticky významná.

Prevalence a faktory asociované s infekcí Tritrichomonas foetus

V naší studii jsme zjistili, že v České republice se vyskytuje u koček *T. foetus* s prevalencí 21,9 % (16/73) a rovněž *Pentatrichomonas hominis* s prevalencí 7 % (4/58). Tato studie je první, která výskyt *T. foetus* u koček v České republice potvrzuje.

Prevalence *T. foetus* u koček v České republice odpovídá hodnotám prevalence *T. foetus* získaných v jiných studiích z Evropy – Británie 14,4 % (Gunn-Moore *et al.* 2007), Francie 14,3 % (Profizi *et al.* 2013), Norsko 21 % (Tysnes *et al.* 2011), Německo 15,7 % (Kuehner *et al.* 2011), Švýcarsko 26 % (Burgener *et al.* 2009), Řecko 20 % (Xenoulis *et al.* 2010). Celkově je pak prevalence v Evropě nižší než mezi kočkami vyšetřenými na výstavách v USA (31 %) (Foster *et al.* 2004) a na Novém Zélandu (82 %) (Kingsbury *et al.* 2010).

Různé studie prokázaly *T. foetus* jako původce chronických průjmů u koček (Gookin *et al.* 1999; Gookin *et al.* 2001; Foster *et al.* 2004; Stockdale *et al.* 2009). Například ve studiích Gookin *et al.* (2001, 2006 a 2007) byli autoři schopni experimentálně navodit průjmy u koťat inokulací *T. foetus* izolovaného z koček s průjmovým onemocněním. Nedávno byl ukázán i signifikantní vztah mezi abnormální konzistencí trusu a infekcí *T. foetus* (Kuehner *et al.* 2011). V mnoha publikacích se autoři zabývají jen detekcí *T. foetus* u koček s chronickými průjmy, nebo zjišťují přítomnost *T. foetus* u koček bez popisu fekálního vzorku a klinických příznaků (Gookin *et al.* 1999; Foster *et al.* 2004; Gookin *et al.* 2004; Gunn-Moore *et al.* 2007; Bissett *et al.* 2008; Burgener *et al.* 2009; Frey *et al.* 2009; Holliday *et al.* 2009; Vermeulen 2009). Klinické příznaky asociované s *T. foetus* jsou pak ještě méně popisovány u koček bez průjmů. Ačkoli nebyla nalezena přímá korelace mezi konzistencí trusu a pozitivním výsledkem PCR na *T. foetus*, bylo postulováno, že *T. foetus* je lépe detekován u koček s průjmy. Někteří autoři však navrhují, že asymptomatické infekce *T. foetus* jsou poměrně časté a mohly by být obecným jevem (Tolbert & Gookin 2009; Gray *et al.* 2010). V naší studii jsme z 86 koček vyšetřili 41,9 % koček s průjmem a 58,1 % bez průjmů. Test na přítomnost *T. foetus* byl

pozitivní u 7 koček s průjmy a u 9 koček bez klinických příznaků. Nicméně z malého počtu 16-ti pozitivních koček nebylo možné statisticky prokázat, u které ze skupin koček se *T. foetus* vyskytuje častěji.

Bylo zjištěno, že kočky nakažené *T. foetus* mohou zcela ztratit příznaky průjmového onemocnění, ale že kočka zůstane *T. foetus* infikována (Foster *et al.* 2004). Tyto kočky pak mohou být zdrojem nákazy pro ostatní, mladší kočky v chovu (Foster *et al.* 2004; Tolbert & Gookin 2009). V naší studii však trpěly průjmovým onemocněním i starší kočky pozitivní na *T. foetus* (6/11) a na průjem trpělo pouze jedno z pěti koťat.

Výjimečně jsou u mladých koťat nakažených *T. foetus* pozorovány příznaky systémového onemocnění, jako je anorexie, deprese, zvracení či ztráta váhy (Bell *et al.* 2010; Holliday *et al.* 2009). Tyto klinické příznaky však nejsou považovány za obecnou asociaci s infekcí *T. foetus* u koček (Kuehner *et al.* 2011) a spekuluje se o tom, že by tyto příznaky mohly být spíše důsledkem koinfekce s jinými enteroparazity (Xenoulis *et al.* 2013). Žádná z koček pozitivní na *T. foetus* v naší studii nevykazovala takovéto systémové příznaky, což by mohlo souviset s tím, že kromě jedné kočky, nebyli u žádné jiné hlášení jiní enteroparazité. Role koinfekce *T. foetus* u koček s jinými enteroparazity, endogenní mikroflórou či environmentálním stresem a imunitním stavem v klinické manifestaci onemocnění ještě není dostatečně objasněna (Gookin *et al.* 1999; Gookin *et al.* 2001; Stockdale *et al.* 2009; Burgener *et al.* 2009; Hosein *et al.* 2013).

Většina studií předpokládá souvislost nákazy *T. foetus* a nízkého věku koček (Foster *et al.* 2004; Gunn-Moore *et al.* 2007; Stockdale *et al.* 2009; Xenoulis *et al.* 2010; Bell *et al.* 2010; Profizi *et al.* 2013), ačkoliv existují i jiné práce, ve kterých byl pozorován opačný trend (Xenoulis *et al.* 2010; Miro *et al.* 2011; Tysnes *et al.* 2011; Holliday *et al.* 2009). V naší práci jsme zaznamenali, že jedinci starší jednoho roku (25 %) jsou častěji nakaženi *T. foetus* než jedinci mladší (17,2 %), avšak po analýze stepwise logistickou regresí nebyl tento trend statisticky podpořen. Příčina rozdílů ve výsledcích různých studií není zřejmá. Důvodem by však mohl být rozdíl ve studovaných populacích koček. Některé studie vyšetřují pouze kočky s průjmem a jiné ne. Vyšší prevalence infekce *T. foetus* mezi koťaty a mladými kočkami je možná způsobena dobou přenosu na kočku v chovu, kde se vyskytuje nákaza *T. foetus* (Kuehner *et al.* 2011). Kuehner *et al.* (2011) se domnívá, že dosavadní menší zastoupení *T. foetus* u starších koček je pouze z toho důvodu, že starší kočky byly obecně méně vyšetřovány na přítomnost *T. foetus* než kočky mladší.

Různé studie identifikovaly rozdíly v citlivosti k infekci *T. foetus* mezi různými čistokrevnými plemeny (Profizi *et al.* 2013; Bell *et al.* 2010; Kuehner *et al.* 2011; Tysnes *et al.* 2011; Gunn-Moore *et al.* 2007). V naší studii jsme se tímto faktorem nezabývali vzhledem k nízkému počtu čistokrevných jedinců různých plemen (9/73). Mezi autory se dále obecně předpokládá genetická predispozice čistokrevných koček k infekci *T. foetus*. Rovněž se ukazuje, že vyšší nákaza čistokrevných koček

může být důsledkem jejich chovu (Gookin *et al.* 1999; Foster *et al.* 2004; Gookin *et al.* 2004; Gray *et al.* 2010). V chovatelských stanicích čistokrevných koček, a také v útulcích s kříženými kočkami, jsou kočky obecně chovány v uzavřených místnostech o vysoké populační hustotě. Tento způsob chovu je považován za klíčový rizikový faktor pro nákazu kočičí střevní trichomoniázou (Gookin *et al.* 2004). Ačkoli je přesný způsob přenosu *T. foetus* neznámý, předpokládá se zvýšené riziko nákazy *T. foetus* v důsledku zvýšeného fekálně-orálního kontaktu (Gookin *et al.* 2004; Tolbert & Gookin 2009). Nicméně je jasné, že jak kočky čistokrevné, tak křížené, se mohou nakazit *T. foetus* (Xenoulis *et al.* 2013). Toto pozorování potvrzuje i naše studie, která zahrnovala 35 % koček čistokrevných a 65 % křížených. *T. foetus* byl identifikován jak u křížených koček (7/16), tak u čistokrevných koček (9/16).

Protože trichomonády nevytvářejí odolné cysty, je pravděpodobné, že pouze čerstvý vlhký trus obsahuje živé infekční trofozoity *T. foetus*, kteří by se mohli roznášet fekálně orální cestou přes kočičí záchodky (Gookin *et al.* 2004; Tolbert & Gookin 2009). V této studii bylo více pozitivních koček, žily po více jak dvou jedincích (25 % versus 14,3 %), avšak vzhledem nízkému počtu pozitivních vzorků nebyl tento trend statisticky významný.

Je pravděpodobné, že riziko fekálně-orálního přenosu je nejvyšší mezi infikovanou matkou a jejími koťaty a následně mezi koťaty ve vrhu (Kuehner *et al.* 2011). Právě chovy koček byly reprezentovány jako nejdůležitější rizikový faktor v nákaze *T. foetus* (Tolbert & Gookin 2009; Gookin *et al.* 2004). Xenoulis *et al.* (2013) ve studii popisuje, že 59 % z 83 koček měly průjmy od doby adopce, což naznačuje nejčastější nákazu koček už v rané fázi jejich života. Diagnostikovat lze proto *T. foetus* i u koček žijících samostatně už několik let (Xenoulis *et al.* 2013). V tomto případě, jak naznačuje Kuehner (2011) a Xenoulis (2013), by mělo mít vyšetřování koček (matek) a jejich koťat v chovech přednost před vyšetřováním jiných dospělých koček. Před odstavením by měla být koťata důkladně vyšetřena na přítomnost *T. foetus*, aby následně při adopci a koupi kotěte nedocházelo k šíření nákazy do jiných chovů. Domníváme se, že by bylo vhodné při dalších epidemiologických studiích zaznamenávat, z jakého typu chovu nakažená kočka pocházela, což by pomohlo upřesnit rizikové faktory pro nákazu *T. foetus*.

Jak již bylo zmíněno, podařilo se nám identifikovat *Tritrichomonas foetus* u 16 koček a 4 psů pomocí nested PCR. Přítomnost *T. foetus* u koček jsme navíc potvrdili izolací kmenů ze tří koček. Domníváme se, že pro potvrzení výskytu *T. foetus* u psů by bylo rovněž zapotřebí izolovat živé kmeny *T. foetus* přímo ze psů. V naší práci jsme však neměli bohužel možnost opakovaného přístupu ke psům, které jsme pomocí nested PCR diagnostikovali jako pozitivních na *T. foetus*. Výskyt *T. foetus* u psů je však zřejmě ve světě velmi nízký. *T. foetus* u psů byl identifikován zatím jen v USA u tří psů s průjmem (Gookin *et al.* 2005; Tolbert *et al.* 2012). Doufáme, že potvrzení infekce *T. foetus* u koček a psů v České republice, pomůže veterinárním lékařům při diagnostikování příčiny průjemových infekcí a jejich následné terapii.

7. ZÁVĚR

V této práci byl popsán nový druh trichomonády rodu *Trichomonas* z ústní dutiny psů a koček, pro který bylo navrženo jméno *Trichomonas bixi*. V ústní dutině psů a koček byl rovněž zjištěn výskyt lidského komenzála *Trichomonas tenax*. V zažívacím traktu koček byl poprvé v České republice zjištěn výskyt patogenního prvoka *Tritrichomonas foetus* a jeho výskyt je rovněž u psů.

Celkově byl *Trichomonas bixi* zjištěn u 34 psů a u 8 koček, *Trichomonas tenax* pak u 9 psů a u 5 koček. Kultivací bylo získáno 39 kmenů orálních trichomonád u psů (OCaX) a 12 kmenů orálních trichomonád u koček (OFeX). Molekulární metodou byly diagnostikovány orální trichomonády u 39/99 psů a u 20/98 koček, střevní trichomonády u 4/11 psů a 31/71 koček. Porovnáním citlivosti metod diagnostiky bylo zjištěno, že nested PCR je citlivější než metoda kultivační, ale při diagnostice orálních trichomonád je spolehlivější používat obě metody.

T. foetus byl identifikován u 4 psů a 16 koček, *P. hominis* byl prokázán u 4 koček. U 2 koček byla zjištěna smíšená infekce *P. hominis* a *T. foetus*. Z 3 koček byly vyizolovány 3 kmeny *Tritrichomonas foetus* (Rhap, Kitty, Charlotte).

Celková prevalence orálních trichomonád bez rozlišení druhu u psů byla 45,2 % (57/126) a u koček 19,3 % (26/135). Na základě statistického výpočtu byli psi častěji infikováni orálními trichomonádami než kočky. Podle našich výsledků lze odhadovat, že křížení psi jsou 3,8krát více vystaveni riziku nákazy než psi čistokrevní ($P = 0,02$), kdežto kočky křížené jsou riziku nákazy vystaveny 0,2krát méně než kočky čistokrevné ($P = 0,02$). Psi chovaní v útulcích mají 0,3krát menší pravděpodobnost se nakazit orálními trichomonádami než psi v domácnostech ($P = 0,05$). Psi se zubními potížemi jsou vystaveni riziku nákazy 4,6krát více než psi se zdravou dutinou ústní ($P = <0,01$). Běžné odčervovací prostředky snižují riziko nákazy až 5,6krát ($P = 0,05$).

Prevalence *Trichomonas bixi* v ústní dutině u psů byla 30,6 % (34/111) a u koček byla 6,6% (8/122). Podle našich výsledků přítomnost *Trichomonas bixi* byla relativně častěji detekována u psů než u koček. *Trichomonas bixi* se vyskytuje 6krát častěji u křížených psů ($P = <0,01$). Psi se zubními potížemi mají 11,6 krát větší pravděpodobnost infekce *Trichomonas bixi* než psi se zdravou dutinou ústní ($P = <0,01$).

Prevalence *Trichomonas tenax* byla u psů 8,1 % (9/111) a u koček byla 4,1 % (5/122). Odčervení psi jsou vystaveni riziku nákazy *T. tenax* 50 krát méně ($P = <0,01$). Vzhledem k nízkému počtu vzorků nakažených koček a psů nebylo možné stanovit význam více faktorů.

Tritrichomonas foetus je díky této studii nově identifikovaným patogenem u koček a psů v České republice. Prevalence *Tritrichomonas foetus* u testovaných koček byla 21,9 % (16/73). Ačkoli v této práci nebyla nalezena žádná asociace mezi infekcí *T. foetus* a přítomností průjmů, je

tento výsledek důležitý, vzhledem k patogennímu potenciálu *T. foetus*, pro veterinární medicínu při diagnostikování příčin chronických průjemových onemocnění u psů a koček.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

18S rRNA	RNA malá podjednotka ribosomu
28S rRNA	RNA velká podjednotka ribosomu
5.8S rRNA	RNA velká podjednotka ribosomu
BSA	bovine serum albumin (hovězí sérový albumin)
CI	confident interval (interval spolehlivosti)
DMSO	dimethyl sulfoxid
FeLV	kočičí leukemický virus
FIV	kočičí imunodeficientní virus
GTR+I+Γ	general time reversible model s gama korekcí a s invariantami (model nukleotidové substituce)
HBB	haemoglobin subunit beta (Hemoglobin beta)
ITS1	internal transcribed spicer 1
ITS2	internal transcribed spicer 2
LB médium	„lysogeny broth“ médium
NA	neanalyzováno
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OCa	Oral Canis
OFe	Oral Felis
OR	odds ratio (křížový poměr)
<i>P</i>	pravděpodobnost
PBS	fosfátem pufrovaný fyziologický roztok
PP	průkaz původu
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rpm	„rotates per minute“, otáčky za minutu
TYSGM	trypton-yeast extract-salt-gastric mucin médium
X-gal	bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid

9. POUŽITÁ LITERATURA

- Amin, A., Bilic, I., Liebhart, D. & Hess, M. (2014). Trichomonads in birds - a review. *Parasitology*, 1-15.
- Bell, E. T., Gowan, R. A., Lingard, A. E., McCoy, R. J., Šlapeta, J. & Malik, R. (2010). Naturally occurring *Tritrichomonas foetus* infections in Australian cats: 38 cases. *J.Feline.Med.Surg.*, 12, 889-898.
- Benchimol, M. (2004). Trichomonads under Microscopy. *Microsc.Microanal.*, 10, 528-550.
- Bernasconi, C., Bodmer, M., Doherr, M. G., Janett, F., Thomann, A., Spycher, C., Iten, C., Hentrich, B., Gottstein, B., Muller, N. & Frey, C. F. (2014). *Tritrichomonas foetus*: prevalence study in naturally mating bulls in Switzerland. *Vet.Parasitol.*, 200, 289-294.
- Bissett, S. A., Gowan, R. A., O'Brien, C. R., Stone, M. R. & Gookin, J. L. (2008). Feline diarrhoea associated with *Tritrichomonas foetus* and Giardia co-infection in an Australian cattery. *Aust.Vet.J.*, 86, 440-443.
- Bissett, S. A., Stone, M. L., Malik, R., Norris, J. M., O'Brien, C., Mansfield, C. S., Nicholls, J. M., Griffin, A. & Gookin, J. L. (2009). Observed occurrence of *Tritrichomonas foetus* and other enteric parasites in Australian cattery and shelter cats. *J.Feline.Med.Surg.*, 11, 803-807.
- BonDurant, R. H. & Honigberg, B. M. (1994). Trichomonads of veterinary importance. In J. P. Kreier (Ed) *Parasitic protozoa* (pp. 172). California: Academic Press, Inc.
- BonDurant, R. H. & Wakenell, P. S. (1994). *Histomonas meleagridis* and relatives. In J. P. Kreier (Ed) *Parasitic protozoa* (pp. 189-204). California: Academic Press, Inc.
- Bowman, D. D., Barr, S. C., Hendrix, C. M. & Lindsay, D. S. (2003). Gastro-intestinal parasites of cats. In D. D. Bowman (Ed) *Companion and exotic animal parasitology* Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
- Brugerolle, G. (1975). Etude de la cryptopleuromitose et de la morphogenese de division chez *Trichomonas vaginalis* et chez plusieurs genres de Trichomonadines primitives. *Protistologica*, 11, 457-468.
- Brugerolle, G. (1976). Cytologie ultrastructurale, systematique et evolution des Trichomonadida. *Annales de la Station Biologique Besse-en-Chandesse*, 10, 1-57.
- Brugerolle, G. (1991). Flagellar and cytoskeletal systems in amitochondrial flagellates: Archamoeba, Metomonada and Parabasala. *Protoplasma*, 164, 70-90.
- Burgener, I., Frey, C., Kook, P. & Gottstein, B. (2009). *Tritrichomonas foetus*: a new intestinal parasite in Swiss cats. *Schweiz.Arch.Tierheilkd.*, 151, 383-389.
- Burrows, R.B., William, G.L., 1967. Intestinal protozoan infections in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 150, 880-883. In: Grellet, A., Brunopolack, Feugier, A., Boucraut-Baralon, C., Grandjean, D., Vandewynckel, L., Cian, A., Meloni, D. & Viscogliosi, E. (2013). Prevalence, risk factors of infection and molecular characterization of trichomonads in puppies from French breeding kennels. *Vet.Parasitol.*, 197, 418-426.
- Ceplecha, V., Svoboda, M., Čepička, I., Husnik, R., Horackova, K. & Svobodova, V. (2013). InPouch TF-Feline medium is not specific for *Tritrichomonas foetus*. *Vet.Parasitol.*, 196, 503-505.

- Chomicz, L., Padzik, M., Laudy, A. E., Kozłowska, M., Pietruczuk, A., Piekarczyk, J., Godineau, N., Oledzka, G. & Kazimierczuk, Z. (2009). Anti-*Pentatrichomonas hominis* activity of newly synthesized benzimidazole derivatives - *in vitro* studies. *Acta Parasitol.*, 54, 165-171.
- Chomicz, L., Zebrowska, J., Zawadzki, P., Myjak, P., Perkowski, K., Rebandel, H. & Kazimierczuk, Z. (2004). Studies on the susceptibility of *Trichomonas hominis* to some abiotic factors. I. Preliminary assessment of antitrichomonal activity of selected compounds *in vitro*. *Wiad.Parazytol.*, 50, 405-409.
- Chunge, R. N., Simwa, J. M., Karumba, P. N., Kenya, P. R., Kinoti, S. N., Muttunga, J. & Nagelkerke, N. (1992). Comparative aetiology of childhood diarrhoea in Kakamega and Kiambu Districts, Kenya. *East Afr.Med.J.*, 69, 437-441.
- Cielecka, D., Borsuk, P., Grytner-Ziecina, B. & Turkowicz, M. (2000). First detection of *Trichomonas tenax* in dog and cat by PCR-RFLP. *Acta Parasitologica*, 45, 350-352.
- Cobo, E. R., Corbeil, L. B., Agnew, D. W., VanHoosear, K., Friend, A., Olesen, D. R. & BonDurant, R. H. (2007). *Tetratrichomonas* spp. and *Pentatrichomonas hominis* are not persistently detectable after intravaginal inoculation of estrous heifers. *Vet.Parasitol.*, 150, 18-26.
- Cobo, E. R., Corbeil, L. B., Gershwin, L. J. & BonDurant, R. H. (2009). Preputial cellular and antibody responses of bulls vaccinated and/or challenged with *Tritrichomonas foetus*. *Vaccine*, 28, 361-370.
- Compaoré, C., Kemta, L. F., Nebie, L., Niamba, P. & Niakara, A. (2013). *Pentatrichomonas hominis* infection in rheumatoid arthritis treated with adalimumab. *Rheumatology.(Oxford)*, 52, 1534-1535.
- Crucitti, T., Abdellati, S., Ross, D. A., Chagalucha, J., Dyck, E. & Buve, A. (2004). Detection of *Pentatrichomonas hominis* DNA in biological specimens by PCR. *Lett.Appl.Microbiol.*, 38, 510-516.
- Da Cunha, A. M. & Muniz, J. (1922). Sobre um flagelado parasito do gato. *Brazil-Medico*, 36, 285-286. In: Pinto, C. (1925). *Protozoarios observados no Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- Dahlgren, S. S., Gjerde, B. & Pettersen, H. Y. (2007). First record of natural *Tritrichomonas foetus* infection of the feline uterus. *J.Small Anim Pract.*, 48, 654-657.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat.Methods*, 9, 772.
- Davaine, C. J. (1860). *Traité des entozoaires et des maladies vermineuses de l'homme et des animaux domestiques*. Paris: Baillière.
- Diamond, L. S. (1957). The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures. *J.Parasitol.*, 43, 488-490.
- Diamond, L. S. (1982). A new liquid medium for xenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other lumen-dwelling protozoa. *J.Parasitol.*, 68, 958-959.
- Dimasuay, K. G. & Rivera, W. L. (2013). Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines. *Vet.Parasitol.*, 196, 289-295.
- Dimasuay, K. G. & Rivera, W. L. (2014). First report of *Trichomonas tenax* infections in the Philippines. *Parasitol.Int.*, 63, 400-402.
- Dobell, C. C. (1939). The common flagellate of the human mouth, *Trichomonas tenax* (O.F.M.): Its discovery and its nomenclature. *Parasitology*, 31, 138-146.

- Doi, J., Abe, N. & Oku, Y. (2013). Molecular survey of *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) 'cat' and 'cattle' genotypes in pigs in Japan. *J.Vet.Med.Sci.*, 75, 475-479.
- Doi, J., Hirota, J., Morita, A., Fukushima, K., Kamijyo, H., Ohta, H., Yamasaki, M., Takahashi, T., Katakura, K. & Oku, Y. (2012). Intestinal *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) infection in Japanese cats. *J.Vet.Med.Sci.*, 74, 413-417.
- Drmota, T. & Král, J. (1997). Karyotype of *Trichomonas vaginalis*. *European Journal Protistology*, 33, 131-135.
- Dryden, M. W., Payne, P. A. & Smith, V. (2006). Accurate diagnosis of *Giardia* spp and proper fecal examination procedures. *Vet.Ther.*, 7, 4-14.
- Duboucher, C., Caby, S., Dufernez, F., Chabe, M., Gantois, N., Delgado-Viscogliosi, P., Billy, C., Barre, E., Torabi, E., Capron, M., Pierce, R. J., Dei-Cas, E. & Viscogliosi, E. (2006). Molecular identification of *Tritrichomonas foetus*-like organisms as coinfecting agents of human *Pneumocystis pneumonia*. *J.Clin.Microbiol.*, 44, 1165-1168.
- Ecco, R., Preis, I. S., Vilela, D. A., Luppi, M. M., Malta, M. C., Beckstead, R. B., Stimmelmayer, R. & Gerhold, R. W. (2012). Molecular confirmation of *Trichomonas gallinae* and other parabasalids from Brazil using the 5.8S and ITS-1 rRNA regions. *Vet.Parasitol.*.
- Čepicka, I., Kutišová, K., Tachezy, J., Kulda, J. & Flegr, J. (2005). Cryptic species within the *Tetratrichomonas gallinarum* species complex revealed by molecular polymorphism. *Vet.Parasitol.*, 128, 11-21.
- Čepička, I., Hampl, V. & Kulda, J. (2010). Critical taxonomic revision of Parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist.*, 161, 400-433.
- Čerkasov, J., Čerkasovova, A., Kulda, J. & Vilhelmova, D. (1978). Respiration of hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. I. ADP-dependent oxidation of malate and pyruvate. *J.Biol.Chem.*, 253, 1207-1214.
- Felleisen, R. S. (1997). Comparative sequence analysis of 5.8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitology*, 115 (Pt 2), 111-119.
- Felleisen, R. S. (1999). Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*. *Microbes.Infect.*, 1, 807-816.
- Felleisen, R. S., Lambelet, N., Bachmann, P., Nicolet, J., Muller, N. & Gottstein, B. (1998). Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences. *J.Clin.Microbiol.*, 36, 513-519.
- Foster, D. M., Gookin, J. L., Poore, M. F., Stebbins, M. E. & Levy, M. G. (2004). Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 225, 888-892.
- Frey, C. F., Schild, M., Hemphill, A., Stunzi, P., Muller, N., Gottstein, B. & Burgener, I. A. (2009). Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats in Switzerland detected by in vitro cultivation and PCR. *Parasitol.Res.*, 104, 783-788.
- Fukushima, T., Mochizuki, K., Yamazaki, H., Watanabe, Y., Yamada, S., Aoyama, T., Sakurai, Y., Mori, H. & Nakazawa, M. (1990). *Pentatrichomonas hominis* from beagle dogs--detection method, characteristics and route of infection. *Jikken Dobutsu*, 39, 187-192.

Ganas, P., Jaskulska, B., Lawson, B., Zadavec, M., Hess, M. & Bilic, I. (2014). Multi-locus sequence typing confirms the clonality of *Trichomonas gallinae* isolates circulating in European finches. *Parasitology*, 141, 652-661.

Goodey, T. (1917). A note on the trichomonad flagellate *Tetratrichomonas buccalis* n.sp. *Parasitology*, 9, 554-557.

Gookin, J. L. An owners guide to diagnosis and treatment of cats infected with *Tritrichomonas foetus*. <http://www.JodyGookin.com> , 1-24. 2009.

Ref Type: Online Source

Gookin, J. L., Birkenheuer, A. J., Breitschwerdt, E. B. & Levy, M. G. (2002). Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces. *J.Clin.Microbiol.*, 40, 4126-4130.

Gookin, J. L., Birkenheuer, A. J., St, J., V, Spector, M. & Levy, M. G. (2005). Molecular characterization of trichomonads from feces of dogs with diarrhea. *J.Parasitol.*, 91, 939-943.

Gookin, J. L., Breitschwerdt, E. B., Levy, M. G., Gager, R. B. & Benrud, J. G. (1999). Diarrhea associated with trichomonosis in cats. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 215, 1450-1454.

Gookin, J. L., Copple, C. N., Papich, M. G., Poore, M. F., Stauffer, S. H., Birkenheuer, A. J., Twedt, D. C. & Levy, M. G. (2006). Efficacy of ronidazole for treatment of feline *Tritrichomonas foetus* infection. *J.Vet.Intern.Med.*, 20, 536-543.

Gookin, J. L., Foster, D. M., Poore, M. F., Stebbins, M. E. & Levy, M. G. (2003). Use of a commercially available culture system for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* infection in cats. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 222, 1376-1379.

Gookin, J. L., Levy, M. G., Law, J. M., Papich, M. G., Poore, M. F. & Breitschwerdt, E. B. (2001). Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. *Am.J.Vet.Res.*, 62, 1690-1697.

Gookin, J. L., Stauffer, S. H., Coccato, M. R., Marcotte, M. J. & Levy, M. G. (2007a). Optimization of a species-specific polymerase chain reaction assay for identification of *Pentatrichomonas hominis* in canine fecal specimens. *Am.J.Vet.Res.*, 68, 783-787.

Gookin, J. L., Stauffer, S. H., Coccato, M. R., Poore, M. F., Levy, M. G. & Papich, M. G. (2007b). Efficacy of tinidazole for treatment of cats experimentally infected with *Tritrichomonas foetus*. *Am.J.Vet.Res.*, 68, 1085-1088.

Gookin, J. L., Stauffer, S. H., Dybas, D. & Cannon, D. H. (2010a). Documentation of in vivo and in vitro aerobic resistance of feline *Tritrichomonas foetus* isolates to ronidazole. *J.Vet.Intern.Med.*, 24, 1003-1007.

Gookin, J. L., Stauffer, S. H. & Levy, M. G. (2007c). Identification of *Pentatrichomonas hominis* in feline fecal samples by polymerase chain reaction assay. *Vet.Parasitol.*, 145, 11-15.

Gookin, J. L., Stebbins, M. E., Hunt, E., Burlone, K., Fulton, M., Hochel, R., Talaat, M., Poore, M. & Levy, M. G. (2004). Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *J.Clin.Microbiol.*, 42, 2707-2710.

Gookin, J. L., Stone, M. R., Yaeger, M. J., Meyerholz, D. K. & Moisan, P. (2010b). Fluorescence in situ hybridization for identification of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed and paraffin-embedded histological specimens of intestinal trichomoniasis. *Vet.Parasitol.*, 172, 139-143.

Gothe, R., Beelitz, P., Schöl, H. & et al. (1992). Trichomonaden-Infektionen der Mundhöhle bei Katzen in Süddeutschland. *Tierarztl Prax*, 20, 195-198. In: Bowman, D. D., Barr, S. C., Hendrix, C. M. & Lindsay, D. S. (2003). Gastro-intestinal parasites of cats. In D. D. Bowman (Ed) *Companion and exotic animal parasitology* Ithaca: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).

Grahn, R. A., BonDurant, R. H., van Hoosear, K. A., Walker, R. L. & Lyons, L. A. (2005). An improved molecular assay for *Tritrichomonas foetus*. *Vet.Parasitol.*, 127, 33-41.

Gray, S. G., Hunter, S. A., Stone, M. R. & Gookin, J. L. (2010). Assessment of reproductive tract disease in cats at risk for *Tritrichomonas foetus* infection. *Am.J.Vet.Res.*, 71, 76-81.

Greene, C. E. (2006). Enteritic protozoal infections. *Infectious diseases of the dog and cat* (pp. 745-750).

Grellet, A., Brunopolack, Feugier, A., Boucraut-Baralon, C., Grandjean, D., Vandewynckel, L., Cian, A., Meloni, D. & Viscogliosi, E. (2013). Prevalence, risk factors of infection and molecular characterization of trichomonads in puppies from French breeding kennels. *Vet.Parasitol.*, 197, 418-426.

Gruby, D. & Delafond, H. M. O. (1843). Recherches sur les animacules se developpant en grand nombre dans l'estomac et dans les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores: Extrait d'une note. *C.R.Acad.Si.Paris*, 17, 1304-1308.

Grytner-Ziecina, B., Cielecka, D., Jaworski, J., Borsuk, P. & Turkowicz, M. (2000). First reports of trichomonosis of the human oral cavity induced by *Tetratrichomonas canistomae*. *Acta Parasitologica*, 45, 207.

Guindon, S. & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst.Biol.*, 52, 696-704.

Gunn-Moore, D. A., McCann, T. M., Reed, N., Simpson, K. E. & Tennant, B. (2007). Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in the UK. *J.Feline.Med.Surg.*, 9, 214-218.

Hale, S., Norris, J. M. & Slapeta, J. (2009). Prolonged resilience of *Tritrichomonas foetus* in cat faeces at ambient temperature. *Vet.Parasitol.*, 166, 60-65.

Hampl, V., Vrlik, M., Cepicka, I., Pecka, Z., Kulda, J. & Tachezy, J. (2006). Affiliation of Cochlosoma to trichomonads confirmed by phylogenetic analysis of the small-subunit rRNA gene and a new family concept of the order Trichomonadida. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.*, 56, 305-312.

Hegner, R. (1928). Experimental studies on the viability and transmission of *Trichomonas hominis*. *Am.J.Hyg.*, 8, 16-34.

Hegner, R. & Ratcliffe, H. (1927a). Trichomonads from the mouth of the dog. *The Journal of Parasitology*, 14, 51-53.

Hegner, R. & Ratcliffe, H. (1927b). Trichomonads from the vagina of the monkey, from the mouth of the cat and man, and from the intestine of the monkey, opossum and prairie-dog. *The Journal of Parasitology*, 14, 27-35.

Hersh, S. M. (1985). Pulmonary trichomoniasis and *Trichomonas tenax*. *J.Med.Microbiol.*, 20, 1-10.

Hillis, D. M. & Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q.Rev.Biol.*, 66, 411-453.

Holliday, M., Deni, D. & Gunn-Moore, D. A. (2009). *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in a rescue colony in Italy. *J.Feline.Med.Surg.*, 11, 131-134.

Honigberg, B. M. (1963). Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J.Protozool.*, 10, 20-63.

Honigberg, B. M. (1990). Trichomonad found outside the urogenital tract of humans. *In Trichomonads Parasitic in Humans*, 342-393.

Honigberg, B. M. & Brugerolle, G. (1990). Structure. In B. M. Honigberg (Ed) *Trichomonads parasitic in humans* (pp. 5-35). New York: Springer-Verlag.

Honigberg, B. M. & Burgess, D. E. (1994). Trichomonads of importance in human Medicine including *Dientamoeba fragilis*. In J. P. Kreier (Ed) *Parasitic Protozoa* (pp. 1-88). California: Academic Press, Inc.

Honigberg, B. M. & Lee, J. J. (1959). Structure and division of *Trichomonas tenax* (O.F. Muller). *Am.J.Hyg.*, 69, 177-201.

Hosein, A., Kruth, S. A., Pearl, D. L., Richardson, D., Maggs, J. C., Peach, H. A. & Peregrine, A. S. (2013). Isolation of *Tritrichomonas foetus* from cats sampled at a cat clinic, cat shows and a humane society in southern Ontario. *J.Feline.Med.Surg.*, 15, 706-711.

Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics.*, 17, 754-755.

Jongwutiwes, S., Silachamroon, U. & Putaporntip, C. (2000). *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg.*, 94, 185-186.

Kazakova, I., Teras, J., Roigas, E., Sardis, C. H., Kumm, R. and Kaal, V. (1980). Trichomonad invasion in respiratory tract and specific agglutinins in the blood sera of patients suffering from lung diseases. *Izvestii Akademii Nauk Estonskoi SSR (Biologija)* 29, 85-94. In Russian, English summary. In: Kutišová, K., Kulda, J., Čepička, I., Flegr, J., Koudela, B., Teras, J. & Tachezy, J. (2005). Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. *Parasitology*, 131, 309-319.

Kim, Y. A., Kim, H. Y., Cho, S. H., Cheun, H. I., Yu, J. R. & Lee, S. E. (2010). PCR detection and molecular characterization of *Pentatrichomonas hominis* from feces of dogs with diarrhea in the Republic of Korea. *Korean J.Parasitol.*, 48, 9-13.

Kingsbury, D. D., Marks, S. L., Cave, N. J. & Grahn, R. A. (2010). Identification of *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* spp. infection in pedigree show cats in New Zealand. *N.Z.Vet.J.*, 58, 6-10.

Kirby, H. (1945). The structure of the common intestinal trichomonad of man. *The Journal of Parasitology*, 31, 163-175.

Kirby, H. (1951). Observations on the trichomonad flagellate of the reproductive organs of cattle. *J.Parasitol.*, 37, 445-459.

Krone, O., Altenkamp, R. & Kenntner, N. (2005). Prevalence of *Trichomonas gallinae* in northern goshawks from the Berlin area of northeastern Germany. *J.Wildl.Dis.*, 41, 304-309.

Kuehner, K. A., Marks, S. L., Kass, P. H., Sauter-Louis, C., Grahn, R. A., Barutzki, D. & Hartmann, K. (2011). *Tritrichomonas foetus* infection in purebred cats in Germany: prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites. *J.Feline.Med.Surg.*, 13, 251-258.

- Kulda, J. & Honigberg, B. M. (1969). Behavior and pathogenicity of *Tritrichomonas foetus* in chick liver cell cultures. *J. Protozool.*, 16, 479-495.
- Kulda, J., Suchánková, E. & Svoboda, S. (1974). Studies on pathogenicity of *Tetratrichomonas gallinarum* in mice and turkey poults. *Acta Vet. Brno*, 43, 53-64.
- Kutišová, K., Kulda, J., Čepička, I., Flegr, J., Koudela, B., Teras, J. & Tachezy, J. (2005). Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. *Parasitology*, 131, 309-319.
- Lahti, C. J. & Johnson, P. J. (1991). *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal proteins are synthesized on free polyribosomes and may undergo processing upon maturation. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 46, 307-310.
- Lawson, B., Robinson, R. A., Neimanis, A., Handeland, K., Isomursu, M., Agren, E. O., Hamnes, I. S., Tyler, K. M., Chantrey, J., Hughes, L. A., Pennycott, T. W., Simpson, V. R., John, S. K., Peck, K. M., Toms, M. P., Bennett, M., Kirkwood, J. K. & Cunningham, A. A. (2011). Evidence of spread of the emerging infectious disease, finch trichomonosis, by migrating birds. *Ecohealth.*, 8, 143-153.
- Leterrier, M., Morio, F., Renard, B. T., Poirier, A. S., Miegeville, M. & Chambreuil, G. (2012). Trichomonads in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification. *New Microbiol.*, 35, 83-87.
- Leuckart, K. G. F. R. (1879). Die Parasiten des Menschen und die von ihnen herrührenden Krankheiten. Leipzig: Winter.
- LeVine, D. N., Papich, M. G., Gookin, J. L., Davidson, G. S., Davis, J. L. & Hayes, R. B. (2011). Ronidazole pharmacokinetics after intravenous and oral immediate-release capsule administration in healthy cats. *J. Feline. Med. Surg.*, 13, 244-250.
- Levine, N. D. (1973). "Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man". Minneapolis: Bruggess.
- Levy, M. G., Gookin, J. L., Poore, M., Birkenheuer, A. J., Dykstra, M. J. & Litaker, R. W. (2003). *Tritrichomonas foetus* and not *Pentatrichomonas hominis* is the etiologic agent of feline trichomonal diarrhea. *J. Parasitol.*, 89, 99-104.
- Levy, M. G., Gookin, J. L., Poore, M. F., Litaker, R. W. & Dykstra, M. (2001). Information on parasitic gastrointestinal tract infections in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 218, 194-195.
- Lewis, K. L., Doherty, D. E., Ribes, J., Seabolt, J. P. & Bensadoun, E. S. (2003). Empyema caused by trichomonas. *Chest*, 123, 291-292.
- Lim, S., Park, S. I., Ahn, K. S., Oh, D. S., Ryu, J. S. & Shin, S. S. (2010). First report of feline intestinal trichomoniasis caused by *Tritrichomonas foetus* in Korea. *Korean J. Parasitol.*, 48, 247-251.
- Lindmark, D. G. & Muller, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.*, 248, 7724-7728.
- Lopez-Escamilla, E., Sanchez-Aguillon, F., Alatorre-Fernandez, C. P., Aguilar-Zapata, D., Arroyo-Escalante, S., Arellano, T., Moncada-Barron, D., Romero-Valdovinos, M., Martinez-Hernandez, F., Rodriguez-Zulueta, P. & Maravilla, P. (2013). New tetratrichomonas species in two patients with pleural empyema. *J. Clin. Microbiol.*, 51, 3143-3146.
- Lun, Z., Parker, S. & Gajadhar, A. A. (2000). Comparison of growth rates of *Tritrichomonas foetus* isolates from various geographic regions using three different culture media. *Vet. Parasitol.*, 89, 199-208.

- Lun, Z. R., Chen, X. G., Zhu, X. Q., Li, X. R. & Xie, M. Q. (2005). Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends Parasitol.*, 21, 122-125.
- Mallat, H., Podglajen, I., Lavarde, V., Mainardi, J. L., Frappier, J. & Cornet, M. (2004). Molecular characterization of *Trichomonas tenax* causing pulmonary infection. *J.Clin.Microbiol.*, 42, 3886-3887.
- Mardell, E. J. & Sparkes, A. H. (2006). Chronic diarrhoea associated with *Tritrichomonas foetus* infection in a British cat. *Vet.Rec.*, 158, 765-766.
- McKeon, T., Dunsmore, J. & Raidal, S. R. (1997). *Trichomonas gallinae* in budgerigars and columbid birds in Perth, Western Australia. *Aust.Vet.J.*, 75, 652-655.
- McMillen, L. & Lew, A. E. (2006). Improved detection of *Tritrichomonas foetus* in bovine diagnostic specimens using a novel probe-based real time PCR assay. *Vet.Parasitol.*, 141, 204-215.
- Meloni, B. P., Thompson, R. C., Hopkins, R. M., Reynoldson, J. A. & Gracey, M. (1993). The prevalence of *Giardia* and other intestinal parasites in children, dogs and cats from aboriginal communities in the Kimberley. *Med.J.Aust.*, 158, 157-159.
- Midlej, V., Vilela, R., Dias, A. B. & Benchimol, M. (2009). Cytopathic effects of *Tritrichomonas foetus* on bovine oviduct cells. *Vet.Parasitol.*, 165, 216-230.
- Miro, G., Hernandez, L., Montoya, A., Arranz-Solis, D., Dado, D., Rojo-Montejo, S., Mendoza-Ibarra, J. A., Ortega-Mora, L. M. & Pedraza-Diaz, S. (2011). First description of naturally acquired *Tritrichomonas foetus* infection in a Persian cattery in Spain. *Parasitol.Res.*, 109, 1151-1154.
- Morimoto, N., Korenaga, M., Nishida, Y., Takeuchi, H., Kumon, Y. & Sugiura, T. (2013). PCR amplification and DNA sequence analysis of parasitic intestinal protozoa in specimens stained with Chlorazol Black E. *Acta Parasitol.*, 58, 132-138.
- Mostegl, M. M., Richter, B., Nedorost, N., Maderner, A., Dinhopl, N. & Weissenböck, H. (2011). Investigations on the prevalence and potential pathogenicity of intestinal trichomonads in pigs using in situ hybridization. *Vet.Parasitol.*, 178, 58-63.
- Mostegl, M. M., Wetscher, A., Richter, B., Nedorost, N., Dinhopl, N. & Weissenböck, H. (2012). Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization. *Vet.Parasitol.*, 183, 209-214.
- Müller, M. (1993). The hydrogenosome. *J.Gen.Microbiol.*, 139, 2879-2889.
- Müller, M. & Lindmark, D. G. (1978). Respiration of hydrogenosomes of *Tritrichomonas foetus*. II. Effect of CoA on pyruvate oxidation. *J.Biol.Chem.*, 253, 1215-1218.
- Neimanis, A. S., Handeland, K., Isomursu, M., Agren, E., Mattsson, R., Hamnes, I. S., Bergsjö, B. & Hirvelä-Koski, V. (2010). First report of epizootic trichomoniasis in wild finches (family Fringillidae) in southern Fennoscandia. *Avian Dis.*, 54, 136-141.
- Okamoto, S., Wakui, M., Kobayashi, H., Sato, N., Ishida, A., Tanabe, M., Takeuchi, T., Fukushima, S., Yamada, T. & Ikeda, Y. (1998). *Trichomonas foetus* meningoencephalitis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 21, 89-91.
- Payne, P. A. & Artzer, M. (2009). The biology and control of *Giardia* spp and *Tritrichomonas foetus*. *Vet.Clin.North Am.Small Anim Pract.*, 39, 993-1007, v.

Pecka, Z., Nohýnková, E. & Kulda, J. (1996). Ultrastructure of *Cochlosoma anatis* Kotlan, 1923 and Taxonomic Position of the Family Cochlosomatidae (Parabasala: Trichomonadida). *European Journal of Protistology*, 32, 190-201.

Pereira-Neves, A. & Benchimol, M. (2009). *Tritrichomonas foetus*: budding from multinucleated pseudocysts. *Protist.*, 160, 536-551.

Pereira-Neves, A., Nascimento, L. F. & Benchimol, M. (2012). Cytotoxic effects exerted by *Tritrichomonas foetus* pseudocysts. *Protist.*, 163, 529-543.

Pereira-Neves, A., Ribeiro, K. C. & Benchimol, M. (2003). Pseudocysts in trichomonads--new insights. *Protist.*, 154, 313-329.

Perez Mesa, C., Stabler, R. & Berthrong, M. (1961). Histopathological Changes in the Domestic Pigeon Infected with *Trichomonas gallinae* (Jones' Barn Strain). *Avian Dis.*, 5, 48-60.

Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R. & Garber, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin.Microbiol.Rev.*, 11, 300-317.

Procházka, B. (1999). Biostatistika pro lékaře, principy základních metod a jejich interpretace. Praha.

Procházka, B. (2014). Biostatistika pro lékaře, principy základních metod a jejich interpretace s využitím systému R. Praha: (v tisku).

Profizi, C., Cian, A., Meloni, D., Hugonnard, M., Lambert, V., Groud, K., Gagnon, A. C., Viscogliosi, E. & Zenner, L. (2013). Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infections in French catteries. *Vet.Parasitol.*, 196, 50-55.

Radosavljevic-Asic, G., Jovanovic, D., Radovanovic, D. & Tucakovic, M. (1994). *Trichomonas* in pleural effusion. *Eur.Respir.J.*, 7, 1906-1908.

Rae, D. O. & Crews, J. E. (2006). *Tritrichomonas foetus*. *Vet.Clin.North Am.Food Anim Pract.*, 22, 595-611.

Rae, D. O., Crews, J. E., Greiner, E. C. & Donovan, G. A. (2004). Epidemiology of *Tritrichomonas foetus* in beef bull populations in Florida. *Theriogenology*, 61, 605-618.

Reinmann, K., Muller, N., Kuhnert, P., Campero, C. M., Leitsch, D., Hess, M., Henning, K., Fort, M., Muller, J., Gottstein, B. & Frey, C. F. (2012). *Tritrichomonas foetus* isolates from cats and cattle show minor genetic differences in unrelated loci ITS-2 and EF-1alpha. *Vet.Parasitol.*, 185, 138-144.

Riedmüller, L. (1928). Ueber die Morphologie, Uebertragungsversuche und klinische Bedeutung der beim sporadischen Abortus des Rindes vorkommenden Trichomonaden. *Zentralbl.Bakteriol.I.Abt.Orig*, 108, 103-118.

Rodning, S. P., Wolfe, D. F., Carson, R. L., Wright, J. C., Stockdale, H. D., Pacoli, M. E., Busby, H. C. & Rowe, S. E. (2008). Prevalence of *Tritrichomonas foetus* in several subpopulations of Alabama beef bulls. *Theriogenology*, 69, 212-217.

Romatowski, J. (1996). An uncommon protozoan parasite (*Pentatrichomonas hominis*) associated with colitis in three cats. *Feline Pract.*, 24, 10-14. In: Gookin, J. L., Stebbins, M. E., Hunt, E., Burlone, K., Fulton, M., Hochel, R., Talaat, M., Poore, M. & Levy, M. G. (2004). Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *J.Clin.Microbiol.*, 42, 2707-2710.

Romatowski, J. (2000). *Pentatrichomonas hominis* infection in four kittens. *J.Am.Vet.Med.Assoc.*, 216, 1270-1272. In: Gookin, J. L., Stebbins, M. E., Hunt, E., Burlone, K., Fulton, M., Hochel, R.,

Talaat, M., Poore, M. & Levy, M. G. (2004). Prevalence of and risk factors for feline *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* infection. *J.Clin.Microbiol.*, 42, 2707-2710.

Rosypal, A. C., Ripley, A., Stockdale Walden, H. D., Blagburn, B. L., Grant, D. C. & Lindsay, D. S. (2012). Survival of a feline isolate of *Tritrichomonas foetus* in water, cat urine, cat food and cat litter. *Vet.Parasitol.*, 185, 279-281.

Rousset, J. J., Laissus, B. & Michel, C. (1970). Preliminary data on canine enzootics due to *Trichomonas canistomae* and *Entamoeba gingivalis* in Parisian dogs. *C.R.Seances Soc.Biol.Fil.*, 164, 2468-2469.

Sansano-Maestre, J., Garijo-Toledo, M. M. & Gomez-Munoz, M. T. (2009). Prevalence and genotyping of *Trichomonas gallinae* in pigeons and birds of prey. *Avian Pathol.*, 38, 201-207.

Sardis, C. H., Teras, J., Roigas, E., Kazakova, I. and Trapido, L. (1983). Allergenic properties of trichomonads inhabiting human respiratory tract. *Izvestii Akademii Nauk Estonskoi SSR (Biologiya)* 32, 134-141. In: Kutišová, K., Kulda, J., Čepička, I., Flegr, J., Koudela, B., Teras, J. & Tachezy, J. (2005). Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. *Parasitology*, 131, 309-319.

Šegović, S., Granić, J., Buntak-Kobler, D. & Potočki-Tukša, K. (1993). *Trichomonas tenax* in human oral cavity. *Acta Stomatol.Croat.*, 27, 255-261.

Shaio, M. F. & Chen, J. G. (1989). Immunoglobulin M-dependent classical complement pathway activation in killing of *Pentatrichomonas hominis*. *Infect.Immun.*, 57, 902-906.

Simic T. Etude biologique et experimentale du *Trichomonas intestinalis*, infectant spontanement l'homme, le chat et le chien. *Ann Parasitol* 1932;10:209-224. In: Gookin, J. L., Stauffer, S. H., Coccato, M. R., Marcotte, M. J. & Levy, M. G. (2007a). Optimization of a species-specific polymerase chain reaction assay for identification of *Pentatrichomonas hominis* in canine fecal specimens. *Am.J.Vet.Res.*, 68, 783-787.

Simitch, T. (1938). *Trichomonas equibuccalis* n. sp. parasite de la bouche dz cheval et de l'ane. *Rivista di parassitologia*, 3, 23-26.

Šlapeta, J., Craig, S., McDonell, D. & Emery, D. (2010). *Tritrichomonas foetus* from domestic cats and cattle are genetically distinct. *Exp.Parasitol.*, 126, 209-213.

Šlapeta, J., Muller, N., Stack, C. M., Walker, G., Lew-Tabor, A., Tachezy, J. & Frey, C. F. (2012). Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmuller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *Int.J.Parasitol.*, 42, 1143-1149.

Smejkalová, P., Petzelková, K. J., Pomajbíková, K., Modrý, D. & Čepicka, I. (2012). Extensive diversity of intestinal trichomonads of non-human primates. *Parasitology*, 139, 92-102.

Stabler, R. M. (1954). *Trichomonas gallinae*: a review. *Exp.Parasitol.*, 3, 368-402.

Stauffer, S. H., Birkenheuer, A. J., Levy, M. G., Marr, H. & Gookin, J. L. (2008). Evaluation of four DNA extraction methods for the detection of *Tritrichomonas foetus* in feline stool specimens by polymerase chain reaction. *J.Vet.Diagn.Invest*, 20, 639-641.

Steinberg, S. (1862). An investigation of the soft white matter which accumulates on the teeth and between them. *Sovremennaja Meditsina Nos.*, 20, 377-380.

- Stockdale, H., Rodning, S., Givens, M., Carpenter, D., Lenz, S., Spencer, J., Dykstra, C., Lindsay, D. & Blagburn, B. (2007). Experimental infection of cattle with a feline isolate of *Tritrichomonas foetus*. *J.Parasitol.*, 93, 1429-1434.
- Stockdale, H. D., Dillon, A. R., Newton, J. C., Bird, R. C., BonDurant, R. H., Deinnocentes, P., Barney, S., Bulter, J., Land, T., Spencer, J. A., Lindsay, D. S. & Blagburn, B. L. (2008). Experimental infection of cats (*Felis catus*) with *Tritrichomonas foetus* isolated from cattle. *Vet.Parasitol.*, 154, 156-161.
- Stockdale, H. D., Givens, M. D., Dykstra, C. C. & Blagburn, B. L. (2009). *Tritrichomonas foetus* infections in surveyed pet cats. *Vet.Parasitol.*, 160, 13-17.
- Stockdale, H. D., Spencer, J. A., Dykstra, C. C., Blagburn, B. L., West, G. S., Hanks, T. & McMillan, K. L. (2006). Feline Trichomoniasis: An Emerging Disease? *Compendium*, 463-471.
- Stoeck, T. & Epstein, S. (2003). Novel eukaryotic lineages inferred from small-subunit rRNA analyses of oxygen-depleted marine environments. *Appl.Environ.Microbiol.*, 69, 2657-2663.
- Sun, Z., Stack, C. & Slapeta, J. (2012). Sequence differences in the diagnostic region of the cysteine protease 8 gene of *Tritrichomonas foetus* parasites of cats and cattle. *Vet.Parasitol.*, 186, 445-449.
- Sutak, R., Dolezal, P., Fiumera, H. L., Hrdy, I., Dancis, A., Delgadillo-Correa, M., Johnson, P. J., Muller, M. & Tachezy, J. (2004). Mitochondrial-type assembly of FeS centers in the hydrogenosomes of the amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101, 10368-10373.
- Switzer, W.P. (1951) Atrophic rhinitis and trichomonads. *Vet. Med.* 46, 478–481. In: Lun, Z. R., Chen, X. G., Zhu, X. Q., Li, X. R. & Xie, M. Q. (2005). Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms? *Trends Parasitol.*, 21, 122-125.
- Swofford, D. L. (2002). *Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*. Ver. 4.0b10. Sunderland, MA, USA.
- Szonyi, B., Srinath, I., Schwartz, A., Clavijo, A. & Ivanek, R. (2012). Spatio-temporal epidemiology of *Tritrichomonas foetus* infection in Texas bulls based on state-wide diagnostic laboratory data. *Vet.Parasitol.*, 186, 450-455.
- Tachezy, J., Tachezy, R., Hampl, V., Sedinova, M., Vanacova, S., Vrlík, M., Van, R. M., Flegr, J. & Kulda, J. (2002). Cattle pathogen tritrichomonas foetus (Riedmuller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species. *J.Eukaryot.Microbiol.*, 49, 154-163.
- Tanabe, M. (1926). Morphological studies on trichomonas. *J.Parasitol.*, 12, 120-130.
- Tolbert, M. K. & Gookin, J. (2009). *Tritrichomonas foetus*: a new agent of feline diarrhea. *Compend.Contin.Educ.Vet.*, 31, 374-81, 390.
- Tolbert, M. K., Leutenegger, C. M., Lobetti, R., Birrell, J. & Gookin, J. L. (2012). Species identification of trichomonads and associated coinfections in dogs with diarrhea and suspected trichomonosis. *Vet.Parasitol.*, 187, 319-322.
- Tolbert, M. K., Stauffer, S. H. & Gookin, J. L. (2013). Feline *Tritrichomonas foetus* adhere to intestinal epithelium by receptor-ligand-dependent mechanisms. *Vet.Parasitol.*, 192, 75-82.

Tumka, A. F. (1956). Trichomonad invasion of the lung. *Klinicheskaia Medicina* 34, 35–40. In Russian. In: Kutišová, K., Kulda, J., Čepička, I., Flegr, J., Koudela, B., Teras, J. & Tachezy, J. (2005). Tetratrichomonads from the oral cavity and respiratory tract of humans. *Parasitology*, 131, 309-319.

Turkiewicz, M. Significance of PCR-RFLP analysis in detection and differentiation of trichomonadid species occurring in the oral cavity. 2004.

Ref Type: Unpublished Work

Tysnes, K., Gjerde, B., Nodtvedt, A. & Skancke, E. (2011). A cross-sectional study of *Tritrichomonas foetus* infection among healthy cats at shows in Norway. *Acta Vet.Scand.*, 53, 39.

Van der Saag, M., McDonell, D. & Slapeta, J. (2011). Cat genotype *Tritrichomonas foetus* survives passage through the alimentary tract of two common slug species. *Vet.Parasitol.*, 177, 262-266.

Van Doorn, D. C., de Bruin, M. J., Jorritsma, R. A., Ploeger, H. W. & Schoormans, A. (2009). Prevalence of *Tritrichomonas foetus* among Dutch cats. *Tijdschr.Diergeneesk.*, 134, 698-700. In: Tysnes, K., Gjerde, B., Nodtvedt, A. & Skancke, E. (2011). A cross-sectional study of *Tritrichomonas foetus* infection among healthy cats at shows in Norway. *Acta Vet.Scand.*, 53, 39.

Vermeulen, B. D. (2009). *Trichomonas foetus* in young cats with chronic diarrhoeas: Comparison of different diagnostic methods . *Utrecht University, Netherlands*.

Walker, R. L., Hayes, D. C., Sawyer, S. J., Nordhausen, R. W., van Hoosear, K. A. & BonDurant, R. H. (2003). Comparison of the 5.8S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *J.Vet.Diagn.Invest*, 15, 14-20.

Wang, H. K., Jerng, J. S., Su, K. E., Chang, S. C. & Yang, P. C. (2006). *Trichomonas empyema* with respiratory failure. *Am.J.Trop.Med.Hyg.*, 75, 1234-1236.

Wenrich, D. H. (1931). Morphological studies on the trichomonad flagellates of man. *Arch.Soc.Biol.Montevideo*, 5, 1185-1204.

Wenrich, D. H. (1944). Morphology of the intestinal trichomonad flagellates in man and of similar forms in monkeys, cats, dogs, and rats. *J.Morphol.*, 74, 189-211.

Wenrich, D. H. (1947). The species of *Trichomonas* in man. *J.Parasitol.*, 33, 177-188.

Wenrich, D. H. & Saxe, L. H. (1950). *Trichomonas microti*, n. sp. (protozoa, Mastigophora). *J.Parasitol.*, 36, 261-269.

Wernery, U. (1991). The barren camel with endometritis--isolation of *Tritrichomonas foetus* and different bacteria. *Zentralbl.Veterinarmed.B*, 38, 523-528.

Xenoulis, P. G., Lopinski, D. J., Read, S. A., Suchodolski, J. S. & Steiner, J. M. (2013). Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats: a retrospective study of 104 cases. *J.Feline.Med.Surg.*, 15, 1098-1103.

Xenoulis, P. G., Saridomichelakis, M. N., Read, S. A., Suchodolski, J. S. & Steiner, J. M. (2010). Detection of *Tritrichomonas foetus* in cats in Greece. *J.Feline.Med.Surg.*, 12, 831-833.

Yaeger, M. J. & Gookin, J. L. (2005). Histologic features associated with *Tritrichomonas foetus*-induced colitis in domestic cats. *Vet.Pathol.*, 42, 797-804.

Yang, C. R., Meng, Z. D., Wang, X., Li, Y. L., Zhang, Y. X. & Zhao, Q. P. (1990). Diarrhoea surveillance in children aged under 5 years in a rural area of Hebei Province, China. *J.Diarrhoeal Dis.Res.*, 8, 155-159.

Zubáčová, Z., Cimburek, Z. & Tachezy, J. (2008). Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol.Biochem.Parasitol.*, 161, 49-54.

Internetové zdroje:

<http://www.R-project.org>

<http://web.natur.cuni.cz/~lem/index.php?p=metody>